

AC

English Abstract for JP 6-503963

New immunoglobulin(s) having marine CDRs in human framework regions - have lower antigenicity; useful for treating e.g. HSV, CMV, T-cell disorders, myeloid disorders and auto-immune conditions

Patent Assignee: PROTEIN DESIGN LABS INC (PROT-N)

Inventor: CO M S; COELINGH K L; LANDOLFI N F; QUEEN C L; SCHNEIDER W P; SELICK H E; CO M

Number of Countries: 049 Number of Patents: 019

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9211018	A1	19920709	WO 91US9711	A	19911219	199230 B
AU 9191726	A	19920722	AU 9191726	A	19911219	199244
			WO 91US9711	A	19911219	
EP 566647	A1	19931027	WO 91US9711	A	19911219	199343
			EP 92903551	A	19911219	
JP 6503963	W	19940512	WO 91US9711	A	19911219	199423
			JP 92503758	A	19911219	

Abstract (Basic): WO 9211018 A

Following are: (1) a compsn. comprising a pure humanised immunoglobulin (Ig) specifically reactive with the p75 chain of the human IL-2 receptor; (2) a humanised Ig capable of binding to human IL-2 receptors and comprising one or more CDRs from mik-beta 1 antibody (Ab) in a human framework; (3) treating T cell mediated disorders by administering the Ig of (2); (4) a compsn. comprising a pure humanised Ig specifically reactive with a herpes simplex virus (HSV)-specific epitope; (5) a compsn. comprising a pure humanised Ig capable of inhibiting binding of an HSV protein to a mouse monoclonal Ab (MAb) specifically reactive with the protein, where the Ig comprises at least 1 CDR from the mouse MAb; (6) a humanised Ig capable of binding to HSV comprising one or more CDRs from mouse MAb Fd 79 or Fd 138-80 in a human framework; (7) treating HSV mediated disorders in a human by administering the Ig of (5); (8) a compsn. comprising pure humanised Ig specifically reactive with a CD33 antigen epitope; (9) a compsn. comprising a pure humanised Ig capable of inhibiting binding of CD33 antigen to a mouse MAb specifically reactive with the antigen, where the Ig comprises at least 1 CDR from the mouse MAb; (10) treating myeloid cell-mediated disorders in a human by administering the compsn. of (9); (11) a compsn. comprising pure humanised Ig specifically reactive with a human cytomegalovirus (CMV)-specific epitope; (12) a compsn. comprising a pure humanised Ig capable of inhibiting binding of a CMV protein to a mouse MAb specifically reactive with the protein, where the Ig comprises at least 1 CDR from the mouse MAb; (13) a recombinant Ig compsn. comprising a human framework and 1 foreign CDRs not naturally associated with the framework, where the Ig can bind to CMV; (14) a humanised Ig capable of binding to CMV and comprising one or more CDRs from a mouse MAb in a human framework, where the MAb is CMV5, CMV109 or CMV115; (15) treating CMV mediated disorders in a human by administering the Ig of (14) or a combination of 2 or more of these Igs; (16) a compsn. comprising pure humanised Ig specifically reactive with human gamma-IFN; (17) a recombinant Ig compsn. comprising a human framework and one or more CDRs not naturally associated with the framework, where the Ig specifically inhibits binding of human gamma-IFN to a human gamma-IFN receptor; and (18) treating autoimmune

disorders in a human be administering the compsn. of (17).

USE/ADVANTAGE - The therapuetic agents and non-immunogenic Abs have strong affinities for their predetermined antigen. They are useful in the treatment of human T cell, HSV and CMV mediated disorders in treating myeloid leukaemia related disorders and in treating human autoimmune disorders. The humanised Igs may be used alone or in combination with chemotherapeutic agents such as non-steroidal anti-inflammatory drugs or immunosuppressants. Antibodies against CMV may be used to detect CMV antigens and to isolated CMV infected cells.



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification ⁵ : A61K 35/14, 39/00, C07K 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 92/11018 (43) International Publication Date: 9 July 1992 (09.07.92)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/US91/09711 (22) International Filing Date: 19 December 1991 (19.12.91) (30) Priority data: 634,278 19 December 1990 (19.12.90) US (71) Applicant: PROTEIN DESIGN LABS, INC. [US/US]; 2375 Garcia Avenue, Mountain View, CA 94043 (US). (72) Inventors: QUEEN, Cary, L. ; 622 Benvenue Street, Los Altos, CA 94022 (US). CO, Man, Sung ; 10230 Yoshino Place, Cupertino, CA 95014 (US). SCHNEIDER, Willi- am, P. ; 484 Loreto Street, Mountain View, CA 94041 (US). LANDOLFI, Nicholas, F. ; 246 Seaside Drive, Milpitas, CA 95035 (US). COELINGH, Kathleen, L. ; 1509 Dolores Avenue, San Francisco, CA 94114 (US).</p>		<p>(74) Agent: SMITH, William, M.; Townsend and Townsend, One Market Plaza, 2000 Steuart Tower, San Francisco, CA 94105 (US). (81) Designated States: AT, AT (European patent), AU, BB, BE (European patent), BF (OAPI patent), BG, BJ (OAPI patent), BR, CA, CF (OAPI patent), CG (OAPI patent), CH, CH (European patent), CI (OAPI patent), CM (OAPI patent), CS, DE, DE (European patent), DK, DK (European patent), ES, ES (European patent), FI, FR (European patent), GA (OAPI patent), GB, GB (Eu- ropean patent), GN (OAPI patent), GR (European pa- tent), HU, IT (European patent), JP, KP, KR, LK, LU, LU (European patent), MC (European patent), MG, ML (OAPI patent), MN, MR (OAPI patent), MW, NL, NL (European patent), NO, PL, RO, SD, SE, SE (European patent), SN (OAPI patent), SU*, TD (OAPI patent), TG (OAPI patent). Published <i>With international search report.</i></p>
<p>(54) Title: IMPROVED HUMANIZED IMMUNOGLOBULINS (57) Abstract Novel humanized immunoglobulins having one or more complementarity determining regions (CDR's) and possible additional amino acids from a donor immunoglobulin and a framework region from an accepting human immunoglobulin are provided for a number of antigens.</p>		

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-503963

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)5月12日

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

序内整理番号

F I

C 1 2 P 21/08

8214-4B

A 6 1 K 35/12

7431-4C

35/72

7431-4C

8931-4B

C 1 2 N 15/00

A

8931-4B

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-503758

(86) (22)出願日 平成3年(1991)12月19日

(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)6月18日

(86)国際出願番号 PCT/US91/09711

(87)国際公開番号 WO92/11018

(87)国際公開日 平成4年(1992)7月9日

(31)優先権主張番号 634, 278

(32)優先日 1990年12月19日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 プロテイン デザイン ラブス, インコーポレイティド

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043,
マウンテン ビュー, ガルシア アベニュー
2375

(72)発明者 クイーン, キャリー エル,

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94022,
ロス アルトス, ペンブニュ ストリート
622

(74)代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改良ヒト化免疫グロブリン

(57)【要約】

1又は複数の相補性決定基 (CDR)、並びに可能として供与性免疫グロブリンに由来する追加のアミノ酸及び受容性ヒト免疫グロブリンに由来するフレームワーク領域を有する新規のヒト化免疫グロブリンを多数の抗原のために提供する。

請求の範囲

1. ヒトIL-2レセプターのp75鎖に特異的に反応性な実質的に純粋な免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 前記免疫グロブリンが約 $10^{-7}M^{-1}$ 又はそれより強力なヒトIL-2レセプターに対する結合親和力を示す、請求項1に記載の組成物。
3. 前記免疫グロブリンが、ヒトp75タンパク質に反応性な免疫グロブリンに由来するCDRに実質的に相同な1又は複数の外来性CDRを含んで成る、請求項1に記載の組成物。
4. 前記免疫グロブリンがヒトIL-2レセプターのp75鎖へのインターロイキン-2 (IL-2) の結合を阻止することができる、請求項1に記載の組成物。
5. 前記ヒト化免疫グロブリンが少なくとも2種類の免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列を有するヒトフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
6. ヒトインターロイキン-2レセプターに結合することのできるヒト化免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンがヒトフレームワークにおいてsik- β 1抗体に由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成る免疫グロブリン。
7. 前記ヒトフレームワークがI α 免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同である、請求項6に記載のヒト化免疫グロブリン。
8. ヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することのできる、請求項8に記載のヒト化免疫グロブリン。
9. ヒト患者におけるT-細胞媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項6に記載の免疫グロブリン

又はPd138-80である、ヒト化免疫グロブリン。

20. 前記ヒトフレームワークがE α 又はF α 免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同である、請求項19に記載のヒト化免疫グロブリン。
21. BSVを中和することのできる請求項19に記載のヒト化免疫グロブリン。
22. ヒト患者におけるヘルペス単純ウイルス媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項14に記載の免疫グロブリンを投与することを含んで成る方法。
23. CD33抗原エピトープに特異的に反応性な実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
24. 前記免疫グロブリンの少なくとも一本の鎖の可変領域がヒトフレームワークにおいて、非ヒト抗体に由来する3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、請求項23に記載の組成物。
25. 前記鎖が重鎖である、請求項24に記載の組成物。
26. 前記非ヒト抗体がH195である、請求項24に記載の組成物。
27. CD33抗原の、該抗原に特異的に反応性なマウスモノクローナル抗体への結合を阻害することのできる実質的に純粋な免疫グロブリンを含んで成り、ここでこのヒト化免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、組成物。
28. 前記ヒト化免疫グロブリンが約 $10^{-7}M^{-1}$ 又はそれより強力な結合親和力を示す、請求項27に記載の組成物。
29. マウスH195抗体のヒト細胞への結合を阻止することのできる、請求項27に記載の組成物。
30. 前記ヒト化免疫グロブリンがE α 免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同であるヒトフレームワークを含んで成る、請求項

を投与することを含んで成る方法。

10. 細胞障害剤と組合せた、請求項6に記載のヒト化免疫グロブリン。
11. ヘルペス単純ウイルス特異的エピトープに特異的に反応性な実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
12. 前記エピトープがウイルスの表層糖タンパク質上にある、請求項11に記載の組成物。
13. 前記糖タンパク質がgB又はgDである、請求項12に記載の組成物。
14. ヘルペス単純ウイルス(HSV)タンパク質の、該タンパク質に特異的に反応性なマウスモノクローナル抗体への結合を阻止することのできる実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物であって、ここでこのヒト化免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、組成物。
15. 前記ヒト化免疫グロブリンが約 $10^{-7}M^{-1}$ 又はそれより強力な結合親和力を示す、請求項14に記載の組成物。
16. 前記免疫グロブリンが1型又は2型のヘルペス単純ウイルス(HSV)に結合することのできる、請求項14に記載の組成物。
17. 前記免疫グロブリンがgB、gD、gC又はgHのHSV糖タンパク質に反応性な免疫グロブリンに由来するCDRに実質的に相同である1又は複数のCDRを含んで成る、請求項14に記載の組成物。
18. 前記免疫グロブリンがIgG、免疫グロブリンAイソタイプである、請求項14に記載の組成物。
19. ヘルペス単純ウイルスに結合することのできる、ヒトフレームワークにおいてマウスモノクローナル抗体に由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成り、ここでこのマウス抗体がPd19

27に記載の組成物。

31. ヒト鎖の細胞及びエフェクター細胞の存在下において抗体依存性細胞障害を媒介することのできる、請求項27に記載のヒト化免疫グロブリン。
32. ヒト患者における骨髄細胞媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んで成る方法。
33. 前記免疫グロブリンが細胞障害剤にコンジュゲートされている、請求項27に記載の組成物。
34. ヒトサイトノガロウイルス-特異的エピトープに特異的に反応性な実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
35. 少なくとも一本の可変領域が、ヒトフレームワークにおいて、非ヒト免疫グロブリン鎖に由来する3つの相補性決定領域を含んで成る、請求項34に記載の組成物。
36. 前記エピトープがウイルス表層糖タンパク質上にある、請求項34に記載の組成物。
37. 前記糖タンパク質がgB又はgHである、請求項35に記載の組成物。
38. サイトノガロウイルス(CMV)タンパク質の、該タンパク質に特異的に反応性なマウスモノクローナル抗体への結合を阻害することのできる実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成り、ここでこのヒト化免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、組成物。
39. 前記ヒト化免疫グロブリンが約 $10^{-7}M^{-1}$ 又はそれより強力な結合親和力を示す、請求項38に記載の組成物。
40. ヒトフレームワーク、及びこのフレームワークに天然には連結していない1又は複数の外来性相補性決定領域(CDR)を含んで成

る組換え免疫グロブリン組成物であって、ここで該免疫グロブリンが CHV に結合することのできる、組換え免疫グロブリン組成物。

41. 前記外来性 CDR の全てが免疫グロブリンの重鎖の上に位置している、請求項40に記載の組成物。

42. 前記免疫グロブリンが IgG 免疫グロブリンアイソタイプである、請求項40に記載の組成物。

43. 前記免疫グロブリンが CHV のヒト細胞への結合を阻止することのできる、請求項40に記載の組成物。

44. 前記フレームワーク領域が少なくとも2種類のヒト免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列を含んで成る、請求項40に記載の免疫グロブリン。

45. サイトメガロウイルスに結合することができ、ヒトフレームワークにおいてマウスモノクローナル抗体に由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成り、ここでこのマウス抗体がCHV5、CHV109又はCHV115である、ヒト化免疫グロブリン。

46. 前記ヒトフレームワークがE_h又はH_o1免疫グロブリンフレームワークに実質的に相当である、請求項45に記載のヒト化免疫グロブリン。

47. CHV を中和することのできる、請求項45に記載のヒト化免疫グロブリン。

48. ヒト患者におけるサイトメガロウイルス感染障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項45に記載の免疫グロブリンを投与することを含んで成る方法。

49. ヒト患者におけるサイトメガロウイルス感染障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な量の2種以上の請求項45に記載の免疫グロブリンの組合せを投与することを含んで成る方法。

50. ヒト α -IFN に特異的に反応性を実質的に純粋なヒト化免疫

グロブリンを含んで成る組成物。

51. 少なくとも一箇の可変領域が、ヒトフレームワークにおいて、非ヒト抗体に由来する3つの相補性決定領域を含んで成る、請求項50に記載の組成物。

52. 前記非ヒト抗体がAF2である、請求項51に記載の組成物。

53. ヒト α -IFN のヒト α -IFN レセプターへの結合を阻害することのできる、請求項50に記載の組成物。

54. ヒトフレームワーク、及びこのフレームワークに天然には連結していない1又は複数の外来性相補性決定領域(CDR)を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、ここで該免疫グロブリンがヒト α -IFN のヒト α -IFN レセプターへの結合を特異的に阻害することのできる、組換え免疫グロブリン組成物。

55. 1又は複数の前記外来性 CDR がAF2 抗体に由来する CDR に実質的に相当である、請求項54に記載の組成物。

56. 前記免疫グロブリンが IgG 免疫グロブリンアイソタイプである、請求項54に記載の組成物。

57. 前記免疫グロブリンが、ヒト α -IFN 抗体のヒト細胞への結合を阻止することのできる、請求項54に記載の組成物。

58. ヒト患者における自己免疫障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項54に記載の組成物を投与することを含んで成る方法。

59. 前記免疫グロブリンが細胞障害剤にコンジュゲートされている、請求項11に記載の組成物。

60. 前記免疫グロブリンが細胞障害剤にコンジュゲートされている、請求項40に記載の組成物。

明 細 書

改良ヒト化免疫グロブリン

発明の分野

本発明は一般に、新規治療薬を開発するための組換え DNA 技術とモノクローナル抗体技術との組合せ、そしてより詳しくは、所望の抗原に対する強い親和力を有する非免疫原性抗体の製造に関する。

発明の背景

1970年代中頃におけるモノクローナル抗体技術の出現は新世代の医薬品の先駆けとなった。ここで初めて研究者及び臨床医師は、所望する抗原部位に対して結合することができ、且つ、種々の免疫学的エフェクター機能を有する本質的に無限な量の均一な抗体に遭遇した。「モノクローナル抗体」として知られるこれらのタンパク質は例えば生体内における有害な細胞の除去において大いに有望であると考えられていた。事実、モノクローナル抗体の臨床的価値はその単独での利用に関して無限であると思われる。

残念ながら、これらのタンパク質に基づく適当な治療薬の開発はモノクローナル抗体の生産に固有ないくつかの欠点によってかなり妨げられている。例えば、ほとんどのモノクローナル抗体はマウスに由来しており、それ故ヒトと完全によく適合しない。これらは更にヒトにおいて用いたときに劇的な免疫グロブリン副反応特性を欠いている。

おそらく最も重要には、非ヒトモノクローナル抗体はヒトの患者の中に注射されたときに免疫原となるかなりのアミノ酸配列を含んであろう。数多くの研究が示すには、外来性抗体の注射の後、患

者により保持される免疫応答はかなり強くなることがあり、初期処置の後のその抗体の治療的有用性は本質的に消えてしまうものである。更に、増え続けている種々のマウス又はその他の抗原性(ヒトに対する)モノクローナル抗体が種々の疾患の処置のために開発されることが予測されるに従い、任意の非ヒト抗体による1又は複数の処置の後のその後の処置は、交差反応性のため、たとえそれとは無関係の治療であったとしても、効かない、又はそれ自体が危険ともなる。

いわゆる「キノウ抗体」(例えば、ヒトの定常領域に連結したマウスの可変領域)の生産はある程度有用であることが実証されているが、決定的な免疫原的な問題が残っている。更に、ヒトB細胞を不死化させる又は所望の抗原に対するヒトイムノグロブリンを生産することのできるヒトハイブリドーマを作り上げる努力は、特に重要なヒト抗原に関連して不成功に終わっている。最近、供与性マウス又はラット免疫グロブリン由来の相補性決定領域(CDR)と組合せたヒトフレームワーク領域を有する免疫グロブリンを生産せしめるのに組換え DNA 技術が利用されている(例えば EP0 公開 0239400号を参照のこと)。このような新規のタンパク質は「再成形化」又は「ヒト化」免疫グロブリンと呼ばれており、そして供与性免疫グロブリンの CDR をヒトフレームワークと組合せることによってそれをヒト免疫グロブリンへと変えるプロセスは「ヒト化」と呼ばれている。ヒト化抗体は重要であり、なぜならそれらはほとんどの抗体と同様に同一の抗原に結合するが、ヒトに注射されたときのその免疫原性は低いからである。

しかしながら、ヒト化手順に関する主たる問題は抗原に対する親和性の消失であり(Josserand *et al.*, 321, 522-525 (1986))、ある状況においては、特に抗原がタンパク質であるとき、10倍以上相違

する(Verhoeyenら*Science*, 239, 1534-1536 (1988))。親和力の消失はむしろ非常に望ましくない。少なくとも、このことはより高い価格及びより高い有害な作用の危険性において、より多量のヒト化抗体を患者に投与しなくてはならないことを意味するであろう。より重要には、低い親和力を有する抗体はより劣った生物学的機能、例えば補体溶解、抗体依存細胞性細胞障害又はウイルス中和を有しうる。例えば、部分的ヒト化抗体HuV8CAMPにおける親和力の消失は補体溶解を媒介するその能力の全ての損失の原因となりうる(Biechmannら, *Nature*, 322, 323-327 (1989); 表1参照)。

従って、所望する抗原と強い親和力で特異的に反応するヒト化抗体が要望されている。このようなヒト化免疫グロブリンはヒトにおいて実質的に非免疫原的であり続けながら、治療薬剤及びその他の用途に適する状態において簡単に、且つ、経済的に生産されるべきである。本発明はこのような及びその他の要望を満足せしめる。

発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、ヒトIL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができしめて/またはヒトIL-2レセプターのp75タンパク質に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1本の鎖がヒトフレームワーク領域セグメントに糖鎖的に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成る鎖を有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^7 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてp75タンパク質に結合することができるヒト抗体を生産することができる。

強力な親和力レベルにおいてCD33抗原に結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンはCD33に対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は化学治療剤、例えば白血細胞に対して活性であるシトシンアラビノースもしくはダウノルビシンと一緒に、又は放射線治療、例えばヨウ素131と複合されて利用される。これらの化合物は全て、白血病及び骨髄細胞により媒介される障害の処置において特に有用である。

本発明は更に、例えばCMVにより媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、CMVレセプターへのCMVの結合を特異的に阻止することができしめて/又はCMV抗原に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に入力して、約 $10^7 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてCMVに結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンはCMVに対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は化学治療剤、例えばアシクロビルもしくはCMV感染細胞に活性なガンシクロビルと一緒に、又は細胞障害剤と組合せて利用される。これらの化合物は全て、CMVにより媒介される障害の処置において特に有用である。

本発明は更に、例えばヒト自己免疫障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は γ -IFNに特異的に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。例えば、追加の天然

これらのヒト化免疫グロブリンはp75に対するCDR-供与性(donating)マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。

本発明は更に、例えばHSVにより媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、HSVレセプターへのHSVの結合を特異的に阻止することができしめて/又はHSV特異的タンパク質に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、その少なくとも1本の鎖はヒトフレームワーク領域セグメントに糖鎖的に連結された1又は複数のマウス相補性決定領域を含んで成る。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に入力して、約 $10^7 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてHSV表面タンパク質に結合することができるヒト抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンはHSVに対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は抗ウイルス剤、例えばアシクロビルもしくはウイルス表面に活性な細胞障害剤と一緒に利用される。これらの化合物は全て、HSVにより媒介される障害の処置において特に有用である。

本発明は更に、例えば骨髄白血球関連ヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物はCD33抗原に特異的に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、その少なくとも1本の鎖はヒトフレームワーク領域セグメントに糖鎖的に連結された1又は複数のマウス相補性決定領域を含んで成る。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に入力して、約 $10^7 M^{-1}$ よりも

由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に入力して、約 $10^7 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいて γ -IFNに結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンは γ -IFNに対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は化学治療剤、例えばステロイド系、抗炎症薬、コルチコステロイド又は免疫抑制剤と一緒に利用される。これらの化合物は全て、自己免疫障害の処置において特に有用である。

図面の簡単な説明

図1。ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスP679抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き換えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図2。ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスP6138-80抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き換えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図3。ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスH195抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。

マウスアミノ酸により置き換えられているヒト抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図4. ヒト抗体(下行)と比べた、マウス α 1k- β 1抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き換えられているヒト抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図5. ヒト抗体(下行)と比べた、マウスCHV5抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き換えられているヒト抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図6. 重鎖及び軽鎖可変ドメインcDNAのアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の図解。RNAはホットフェノール抽出法を利用して約10⁶個のハイブリドマ細胞から調製した。簡潔すると、細胞をRNA抽出緩衝液(50mMの酢酸ナトリウムpH 5.2/1%のSDS)1ml中に再懸濁し、次いでボルテックスにかけ、0.5mlのフェノールpH 5.2により65℃で15分間、続いて氷上で更に15分間抽出した。水性相を回収し、そしてエタノールで2回沈降を行った。逆転写酵素(BRL, Bethesda, MD)及びプライマーとしてオリゴ-dT₁₈₋₃₀(Pharmacia, Piscataway, NJ)を用いて10 μ gの全RNAからcDNAを合成した。ポリ(dG)テールを末端デオキシスクレオチドトランスフェラーゼ(BRL)(B. V. Lohら, *Science* 243, 217 (1989))を用いてcDNAの3'末端に連結させ、可変ドメイン遺伝子(V) AmpliTaq(Parkin

Bioer-Cetus)を用い、ポリ(dG)テールにハイブリダイズするプライマー-c045 (TAATCTAGCAATTCGCCGCCGCCGCCGCC)及び定常領域遺伝子(C)にハイブリダイズするプライマーにより増幅させた。軽鎖に関して利用したプライマーはc045 (TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC)とした。重鎖に関して利用したプライマーはc047 (TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATCGGC(GC)TGT(TC)GTTTGGC)とした。

かつこの配列は塩基組成を示している。この塩基は、このプライマーがほとんどのガンマー鎖とハイブリダイズできるように導入した。増幅させたフラグメントを次にEcoRI及びHindIIIにより消化し、そしてシーケンシングのためにpUC18ベクターの中にクローンした。

図7. 抗体 α 1k- β 1の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のcDNAの配列及び翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質はアミノ酸23Qより、そして成熟重鎖タンパク質はアミノ酸20Qより開始し、対応のシグナル配列が先行している。

図8. プラスミドpVg1-dhfr(A)及びpVK(B)の図解。プラスミドpVg1-dhfrは以下の部分を含む: amp及びdhfr遺伝子を含む約4200塩基対のBamHI-EcoRIフラグメント; ヒトサイトメガロウイルスB1遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む630bpのフラグメント(Boehartら^{Cell} 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端においてEcoRI及びXbaIリンカーがそれぞれフラックしている); 並びに215bpの先行イントロン及びポリ(A)シグナルを有するヒトガンマー1定常領域遺伝子を含む2800bpのXbaI-BamHIフラグメント。プラスミドpVKは、ガンマー1遺伝子を1530bpのヒトカバー定常領域遺伝子に置き換え、そしてdhfr遺伝子をgpt遺伝子に置き換えることで同様に作製した。これらのプラスミドは当業

界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した(Nasiatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照のこと)。例えばpVg1-dhfrはプラスミドpVg1(1990年9月28日提出の共有譲渡米国特許出願第07/590,274号)より、bys遺伝子含有HindIII-BglIIフラグメントを、dhfr遺伝子を含みそしてBglII部位に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した(Simonsenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))。

図9. アイストープ結合化コントロール抗体(-)、ヒト化 α 1k- β 1抗体(---)、キメラ α 1k- β 1抗体(····)により染色したF17J8細胞のフローサイトメトリー。細胞を約5 \times 10⁶/mlにてFACS緩衝液(PBS+2%のBSA+0.1%のアザイド)の中に懸濁した。100 μ lの細胞懸濁物をポリスチレンチューブに移し、そして精製抗体100ngと氷上で30分間インキュベートした。この細胞をFACS緩衝液で洗い、次いでヤギ抗ヒトIg抗体と氷上で更に30分間インキュベートした。次にこの細胞を洗い、そしてFITCラベル化ウサギ抗-ヤギIg抗体と30分間インキュベートした。この細胞を再び洗い、そして最後にPBS+1%のパラホルムアルデヒドの中に再懸濁させた。細胞をFACSscan (Becton Dickinson)で分析した。

図10. ヒト化 α 1k- β 1抗体(下行)及びヒトLay抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)のアミノ酸配列(シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおけるアミノ酸又は共通のヒトアミノ酸に二重下線を付した。

図11. ヒト化 α 1k- β 1重鎖(B)及び軽鎖(A)の作製に用いたオリゴヌクレオチド。以下の対のオリゴヌクレオチドを混ぜ、シ

ーケナーゼで伸長し、そしてpブルースクリプトIIks(+)ベクターへのリゲーション前に表示の酵素で切断した: wps54とvc11をXbaIとSalIにより、vc12とwps57をXbaIとSalIにより、vc16とvc13をXbaIとKpnIにより、vc14とvc15をXbaIとKpnIにより。次にwps54-vc11とvc12-wps57のフラグメントをXbaIとSalIで切り出し、pVg1-dhfrのXbaI部位の中に一緒にリゲートした。また、vc16-vc13フラグメントとvc14-vc15フラグメントをXbaIとKpnIで切り出し、そしてpVKのXbaI部位の中に一緒にリゲートした。

図12. F17J8細胞へのラベル化 α 1k- β 1トレーサーの競合結合。約10⁶のF17J8細胞を3.0ngのラジオラベル化マウス α 1k- β 1抗体(B/C1/ μ g)とインキュベートし、次いで200 μ lの結合用緩衝液(PBS+10%の胎児牛血清+0.1%のNaN₃+10 μ g/mlのマウスモノクローナルIg)中の様々な量の未ラベルマウス α 1k- β 1抗体(●)又はヒト化 α 1k- β 1抗体(○)のいづれかとインキュベートした。0で2時間インキュベーションした後、この細胞をマウスIgを含まない結合用緩衝液で2回洗い、そして遠心により集めた。細胞への放射活性結合を測定し、そして結合/遊離cpaの比で表わした。

図13. ヒト化 α 1k- β 1+ヒト化抗-Tac抗体によるヒトPBA芽細胞のIL-2刺激増殖の阻害。抗体なし(□)、それぞれ2 μ gのヒト化 α 1k- β 1及びヒト化抗-Tac添加(■)。

図14. ネズミ及びヒト化F479抗体の重鎖(A)及び軽鎖(B)、並びにネズミ及びヒト化F479-80抗体の重鎖(C)及び軽鎖(D)のアミノ酸配列。cDNAより推定したネズミ抗体の配列(上行)をヒト化抗体配列(下行)と並べて示す。ヒト化F479及びF479-80フレームワーク配列はF0a抗体及びF0b抗体それぞれに由来する。残基は

Kabat系に従って番号付けした(B.A.Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (1987))。各鎖の3つのCDRを持て囲った。ネズミ配列により置き換えられた、又は共通ヒト配列のP₀又はB₀フレームワーク中の残基に下線を付した。

図15. プラスミドpVg1 (A) 及びpVg1 (B) の図解。プラスミドpVg1を以下のフラグメントより作製した: *asp*及び*hys*遺伝子を含むプラスミドpSV2kbpに由来する約4850塩基対の*Bam*HI-EcoRIフラグメント(ヒトサイトメガロウイルス181遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む630bpのフラグメント(Boshartら、Cell 41, 521 (1985)) (その5' 及び3' 末端にてそれぞれEcoRI及びXbaIリンカーがフランクしている); 並びに215bpの先行イントロン及びポリ(A)シグナルを有するヒトガンマー1定常領域遺伝子を含む2800bpのXbaI-BamHIフラグメント。プラスミドpVg1は、1530-bpのヒトカッパー定常領域遺伝子をガンマー1遺伝子で置き換え、そして*spt*を*hys*遺伝子で置き換えて同様に作製した。

図16. Pd79 (A) 及びPd138-80 (B) 抗体により染色したHSV-1感染Vero細胞のサイトメトリー。アイソトープ結合化コントロール抗体(---)、ヒト化抗体(---)、キメラ抗体(---)。Vero細胞にHSV-1 (Δ305 突然変異体 (F株)) を3 pfu/細胞にて一夜感染させた。細胞をトリプシンにより0.5mg/mlにて1分処理し、PBSでよく洗い、そしてPACS緩衝液(PBS+2%のBSA+0.1%のアジド)中で約5×10⁴/mlで再懸濁した。100μlの細胞懸濁物をポリスチレンチューブに移し、そして100ngの精製抗体と氷上で30分間インキュベートした。この細胞をFACS緩衝液で洗い、そしてFITCラベル化ヤギ抗ヒト抗体(Cappel)と氷上で更に30分間インキュベートした。この細胞を再び洗い、そして最後にPBS+

ミドpVg1-dhfrは以下の部分を含む: *asp*及び*dhfr*遺伝子を含む約4200塩基対の*Bam*HI-EcoRIフラグメント; ヒトサイトメガロウイルス181遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む630bpのフラグメント(BoshartらCell 41, 521 (1985)) (その5' 及び3' 末端においてEcoRI及びXbaIリンカーがそれぞれフランクしている); 並びに215bpの先行イントロン及びポリ(A)シグナルを有するヒトガンマー1定常領域遺伝子を含む2800bpのXbaI-BamHIフラグメント。プラスミドpVg1は、ガンマー1遺伝子を1530bpのヒトカッパー定常領域遺伝子で置き換え、そして*dhfr*遺伝子を*spt*遺伝子で置き換えることで同様に作製した。これらのプラスミドは当業界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した(Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと)。例えばpVg1-dhfrはプラスミドpVg1より、*hys*遺伝子含有*Hind*III-BglIIフラグメントを、*dhfr*遺伝子を含みそして*Bal*II部位に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した(Simonsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2495 (1983))。

図21. 抗体なし(---)、ヒト化H195抗体(---)、キメラH195抗体(---)により染色したU937細胞のフローサイトメトリー。細胞を約5×10⁴/mlにてPACS緩衝液(PBS+2%のBSA+0.1%のアジド)の中に懸濁した。100μlの細胞懸濁物をポリスチレンチューブに移し、そして精製抗体50ngと氷上で30分間インキュベートした。この細胞をPACS緩衝液で洗い、次いでFITCラベル化ヤギ抗ヒト抗体と氷上で更に30分間インキュベートした。この細胞を再び洗い、そして最後にPBS+1%のバラホルムアルデヒドの中に再懸濁させた。細胞をFACSmate (Becton Dickinson) で分析した。

1%のバラホルムアルデヒドの中で再懸濁した。細胞をFACSmate (Becton Dickinson) で分析した。

図17. Pd79 (A) 及びPd138-80 (B) によるHSV-1の中和。いくつかの希釈率の抗体を100pfuのウイルスと混ぜ、次いで37℃で1時間インキュベートした。これらのウイルスを次に集密Vero細胞を有する8ウェルプレートに接種し、そして37℃で1時間吸着させた。この細胞に、培地中の1%のアガロスを加え、そして4日間インキュベートした。ブラックを中性レッドで染めた。

図18. (A) ネズミ又はヒト化Pd79、(B) ネズミ又はヒト化Pd138-80による、組織培養物に散布したウイルスからの細胞の防御を調べるための感染化Vero細胞単層の免疫染色。集密Vero細胞の24穴プレートにウイルスを0.1pfu/細胞で接種し、次いで培地に10μg/mlの抗体200μlを加える前に37℃で2時間吸着させた。4日目の終わりに、培養培地を除去し、そしてプレートを37℃のインキュベーターの中に一夜置いて乾かした。ウイルス抗原を検出するため、各ウェルを200μlの抗-gB抗体と0.5μg/mlにおいて37℃で1時間インキュベートし、2回洗い、そして200μlのペオキシゲンゼコンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG(Cappel, 1:300希釈)と1時間、37℃でインキュベートした。このプレートを洗い、次いで基質3-アミノ-9-エチルカルバゾール(ABC)(Sigma, St. Louis, MO)で室温において15分間染色させた。反応を水ですすいで停止させ、次いで風乾した。

図19. 抗体H195の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のcDNAの配列及び翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質はアミノ酸21Dより、そして成熟重鎖タンパク質はアミノ酸20Eより開始し、対応のシグナル配列が先行している。

図20. プラスミドpVg1-dhfr (A) 及びpVg1 (B) の図解。プラス

図22. ヒト化H195抗体(下行)及びヒトBu抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)のアミノ酸配列(シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおける残基に二重下線を付した。

図23. ヒト化H195重鎖(A: aa1-4)及び軽鎖(B: aa5-8)の作製に用いたオリゴヌクレオチド。以下の対のオリゴヌクレオチドを混ぜ、クレンジングポリマーで伸長し、そしてpUC18へのリゲーション前に表示の酵素で切断した: aa1とaa2をXbaIとEpoIにより、aa3とaa4をXbaIとEpoIにより、aa5とaa6をXbaIとHindIIIにより、aa7とaa8をXbaIとHindIIIにより。次にaa1-aa2とaa3-aa4のフラグメントをXbaIとEpoIでpUC18から切り出し、pVg1-dhfrのXbaI部位の中に一緒にリゲートした; また、aa5-aa6フラグメントとaa7-aa8フラグメントをXbaIとHindIIIで切り出し、そしてpVg1のXbaI部位の中に一緒にリゲートした。

図24. U937細胞へのラベル化H195トレーナーの結合。約4×10⁴のU937細胞を4.5mgのラジオーヨウ素化マウスH195抗体(5μCi/μg)とインキュベートし、次いで200μlの結合用緩衝液(PBS+2%の胎児牛血清+0.1%のアジ化ナトリウム)中の様々な量の未ラベル化マウスH195抗体(●)又はヒト化H195抗体(○)のいづれかとインキュベートした。0℃で2時間インキュベーションした後、この細胞を結合用緩衝液で2回洗い、そして遠心により集めた。細胞への放射能結合を測定し、そして結合/全量cpmの比で表わした。

図25. 抗体H195の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のcDNAの配列及び翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質の開始点を矢印で示し、対応のシグナル配列が先行している。

図26. プラスミドpVg1-dhfr (A) 及びpVK(B) の図解。プラスミドpVg1-dhfrは以下の部分を含む: amp及びdhfr遺伝子を含む約4200塩基対のBamHI-EcoRIフラグメント; ヒトサイトメガロウイルスIE1遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む630bpのフラグメント(BoshartらCell 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端においてEcoRI及びXbaIリンカーがそれぞれフランクしている); 並びに215bpの先行イントロン及びポリ(A)シグナルを有するヒトガンマー1定常領域遺伝子を含む2800bpのXbaI-BamHIフラグメント。プラスミドpVKは、ガンマー1遺伝子を1530bpのヒトカッパー定常領域遺伝子に置き換え、そしてdhfr遺伝子をgpt遺伝子に置き換えることで同様に作製した。これらのプラスミドは当業界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した(Hanietisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと)。例えばpVBP, Laser JetシリーズII SPLASE IIは、hys遺伝子含有HindIII-BglIIフラグメントを、dhfr遺伝子を含みそしてSalII部に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した(Simonsenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 2495 (1983))。

図27. ヒト化CMV5抗体(下行)及びヒトNo1抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)のアミノ酸配列(シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおける残基又は共通のヒトアミノ酸に二重下線を付した。

図28. ヒト化CMV5軽鎖(A: j616-j619)及び重鎖(B: j620-j622)の作製に用いたオリゴヌクレオチド。以下の対のオリゴヌクレオチドを混ぜ、クレノウポリメラーゼで伸長し、そしてpUC18へ

のリゲーション前に表示の酵素で切断した: j616とj617をXbaIとEcoRIにより、j618とj619をXbaIとEcoRIにより、j620とj621をXbaIとKpnIにより、j622とj623をXbaIとKpnIにより。次にj616-j617とj618-j619のフラグメントをXbaIとHincIIで切り出し、そしてpVKのXbaI部位の中に一緒にリゲートした; また、j620-j621フラグメントとj622-j623フラグメントをXbaIとKpnIで切り出し、そしてpVg1-dhfrのXbaI部位の中に一緒にリゲートした。

図29. CMV感染細胞へのラベル化CMV5トレーサの融合結合。マウス(●)又はヒト化(○)CMV5抗体の量を増やしながらトレーサーラジオ同位素化マウスCMV5と共にCMV-感染細胞に加え、次いで細胞に結合したトレーサの量を決定した。

図30. 抗体AP2の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のcDNAの配列及び翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質はアミノ酸30Nより、そして成熟重鎖タンパク質はアミノ酸38Qより開始し、対応のシグナル配列が先行している。

図31. プラスミドpVg1-dhfr (A) 及びpVK(B) の図解。プラスミドpVg1-dhfrは以下の部分を含む: amp及びdhfr遺伝子を含む約4200塩基対のBamHI-EcoRIフラグメント; ヒトサイトメガロウイルスIE1遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む630bpのフラグメント(BoshartらCell 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端においてEcoRI及びXbaIリンカーがそれぞれフランクしている); 並びに215bpの先行イントロン及びポリ(A)シグナルを有するヒトガンマー1定常領域遺伝子を含む2800bpのXbaI-BamHIフラグメント。プラスミドpVKは、ガンマー1遺伝子を1530bpのヒトカッパー定常領域遺伝子に置き換え、そしてdhfr遺伝子をgpt遺伝子に置き換えることで同様に作製した。これらのプラスミドは当業界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した

界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した(Hanietisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと)。例えばpVg1-dhfrはプラスミドpVg1(1990年9月28日提出の共有特許米国特許出願第07/590,274号)より、hys遺伝子含有HindIII-BglIIフラグメントを、dhfr遺伝子を含みそしてSalII部に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した(Simonsenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 2495)。

図32. ヒト化AP2抗体(下行)及びヒトEa抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)のアミノ酸配列(シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおける残基又は共通のヒトアミノ酸に二重下線を付した。

図33. ヒト化AP2軽鎖(A: rh10-rh13)及び重鎖(B: rh20-rh23)の作製に用いたオリゴヌクレオチド。以下の対のオリゴヌクレオチドを混ぜ、クレノウポリメラーゼで伸長し、そしてpUC18へのリゲーション前に表示の酵素で切断した: rh10とrh11をXbaIとHindIIIにより、rh12とrh13をXbaIとHindIIIにより、rh20とrh21をXbaIとEcoRIにより、rh22とrh23をXbaIとEcoRIにより。次にrh10-rh11とrh12-rh13のフラグメントをXbaIとHindIIIで切り出し、pVKのXbaI部位の中に一緒にリゲートした; また、rh20-rh21フラグメントとrh22-rh23フラグメントをXbaIとXhoIで切り出し、そしてpVg1-dhfrのXbaI部位の中に一緒にリゲートした。

図34. r-IFNと様々な濃度のマウスAP2抗体と共にインキュベートし、そして抗-HLA-D抗体により塗めたB52847細胞の蛍光。

発明の詳細な説明

本発明に従い、強力な親和力で所望の抗原に特異的に結合できる新規なヒト化免疫グロブリンが提供される。これらの免疫グロブリンは人体において実質的に非免疫原性であるが、しかし少なくとも約 $10^6 M^{-1}$ 、好ましくは $10^7 M^{-1}$ ~ $10^8 M^{-1}$ 又はそれより強い結合親和力を有する。該ヒト化免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク及びI又はII鎖の相補性決定領域(CDR)、それに加えて抗原に特異的に反応する供与免疫グロブリンに由来する一定の数のその他のアミノ酸を有するであろう。該免疫グロブリンは経済的に大量に生産でき、そして例えば種々の技術によって種々のヒト障害の処置における利用性が見出される。

本発明をより完全に理解してもらうため、いくつかの定義を記載する。本明細書で用いる語「免疫グロブリン」は免疫グロブリン遺伝子により実質的にコード化されるI又はII鎖のポリペプチドより成るタンパク質に因する。認識されている免疫グロブリン遺伝子はカッパー、ラムダ、アルファ、ガンマ(IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄)、デルタ、エプシロン及びミュー定常領域、並びに骨髄免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。会長免疫グロブリンの「軽鎖」(約25kd又は214のアミノ酸)は可変領域遺伝子により3H末端にて(約110のアミノ酸)、そしてカッパー又はラムダ定常領域遺伝子はC00H末端にてコードされる。会長免疫グロブリンの「重鎖」(約50kd又は445のアミノ酸)は可変領域遺伝子(約116のアミノ酸)及び上記その他の定常領域遺伝子のうちの1つ、例えばガンマ(約330のアミノ酸をコードする)により同様にコードされる。

免疫グロブリンの一形態は抗体の基本的な構造単位を構成する。この形態は四重体であり、そして同一の2対の免疫グロブリン鎖より成り、それぞれの対は一本の軽鎖と一本の重鎖を有する。各対に

において、その軽及び重鎖の可変領域は共に抗原に対する結合性のもととなっており、そしてその定常領域は抗体のエフェクター機能のもととなっている。抗体に加えて、免疫グロブリンは種々のその他の形態において存在することができ、それには例えば Fv, Fab 及び (Fab')₂、並びに二価ハイブリッド抗体(例えば Lenzavacchiaら、*Eur. J. Immunol.*, 17, 105 (1987)) 及び一本鎖(例えば, Hustonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883 (1988) 及び Birdら、*Science*, 242, 423-426 (1988)) が含まれる。(一般に、Hoodらの "Immunology" Benjamin, N.Y. 第2版 (1984)、及び Hunkapiller と Hoodの *Nature*, 323, 15-16 (1986) を参照のこと)。

3つの超可変領域により干渉されている「フレームワーク」領域より成る免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖可変領域は CDRとも呼ばれる。フレームワーク領域及び CDRの長さは正確に決定されている ("Sequences of Proteins of Immunological Interest" E. Kabat ら、U.S. Department of Health and Human Services (1983) を参照のこと)。種々の軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列が一つの種の中に関連して保存されている。本明細書で用いる「ヒトフレームワーク領域」とは、天然由来のヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に実質的に同一(約85%以上、通常は90~95%又はそれ以上)であるフレームワーク領域である。構造的軽鎖及び重鎖の組合せフレームワーク領域は CDRを位置決めし、且つ、近接するために働く。CDRは抗原のエピトープへの結合のための主因である。

キメラ抗体は、その軽鎖及び重鎖遺伝子が典型的には遺伝子工学により、異なる種に属する免疫グロブリンの可変及び定常領域遺伝子から作製された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する遺伝子の可変セグメントをヒト定常セグメント、例えばガンマー1及びガンマー3に連結させることができる。典型的な治

療用キメラ抗体はそれ故マウス抗体に由来する可変性又は抗原結合性ドメインとヒト抗体より成るハイブリッドタンパク質(例えば A.T.C.C.受託番号 CRL 9688は抗-Tac キメラ抗体を生産する)であるが、しかしながらその他の哺乳動物の種も利用される。

本明細書で用いる語「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域及び非ヒト(通常はマウス又はラット)免疫グロブリンに由来する1又は複数の CDRを含んで成る免疫グロブリンに関する。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンを「供与体」と呼び、そしてフレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「受容体」と呼ぶ。定常領域は存在している必要はないが、しかしもしそれらがあるならば、それらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、即ち、少なくとも約85~90%、好ましくは約95%以上同一であるべきである。従って、ヒト化免疫グロブリン全体は、可能としては CDRを除き、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」はヒト化軽鎖及びヒト化重鎖イムノグロブリンを含んで成る抗体である。例えば、ヒト化抗体は例えば上記に定義したような典型的なキメラ抗体を含まず、なぜならキメラ抗体の全可変領域は非ヒトであるからである。供与抗体は「ヒト化」のプロセスによって「ヒト化」されると言われており、なぜなら得られるヒト化抗体は CDRを提供する供与抗体のそれと同じ抗原に結合することが予測されるからである。

本法により設計されたヒト化抗体は、抗原結合性又はその他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさない追加の保存性アミノ酸置換を有しうる。保存性置換とは組合せ、例えば gly, ala, val, ile, leu, asp, glu, asn, gln, ser, thr, lys, arg; 及び phe, try を意図している。

ヒト化抗体を含むヒト化免疫グロブリンは遺伝子工学によって作

製されている。既に説明されているほとんどヒト化免疫グロブリン(Jonesら、前掲; Verhoevenら、前掲; Blechmannら、前掲)は、特定の免疫グロブリン鎖のフレームワークと同一のフレームワーク、受容体、及び非ヒト供与体免疫グロブリン鎖に由来する3つの CDRを含んで成る。あるケースにおいては(Blechmannら、前掲)、フレームワーク中の2個の付加アミノ酸を別のヒトフレームワーク領域中のアミノ酸と同じになるように変えている。本発明は基準を含んでおり、これに従い、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を強めるため、ヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の一定数のアミノ酸が、受容体ではなく供与体におけるその位置のアミノ酸と同じであるように選ぶ。

本発明は、(例として CDRの入手源としてマウス抗体を使って)ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の2つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく:

(1) マウス CDRをヒトフレームワークと結合する時、CDRに密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかに CDRを歪め、そして歪められた CDRは供与抗体中の CDRが行うのと同じくらい効果的な抗原との接触を行うことができないと考える;

(2) また、CDRに密接しているがその一部ではない(即ちまだフレームワークの一部である)元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の原因である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

(3) 注射したマウス抗体はヒトの循環系の中で、正常な抗体の

半減期よりもはるかに短い半減期を有することが報告されている(D. Shawら、*J. Immunol.*, 138, 4534-4538 (1987))。注射したヒト化抗体は天然由来のヒト抗体とより同等な半減期を有することが予測され、より少ない量、且つ、より少ない投与量で投与されることが可能となる。

これらの問題を回避し、且つ、所望の抗原に対して非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するための1又は複数の以下の原理を利用する。更に、それらの基準は単独で、又は必要ならば組合せて利用することで、所望の親和力又は他の特徴を獲得することができる。

原理は、受容体として、ヒト化すべき供与体免疫グロブリンとは通常相同性でない特定のヒト免疫グロブリンに由来するフレームワークを利用するか、又は数多くのヒト抗体に由来する共通フレームワークを利用することにある。例えば、データバンク(例えばナショナル バイオメディカル リサーチ ファウンデーション プロテイン アイデンティフィケーション リソース)における、ヒトの重(又は軽)可変領域に対するマウスの重(又は軽)鎖可変領域の配列の比較が示すには、異なるヒト領域に対する相同性の程度は典型的には約40%から約60~70%まで大きく変動する。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖(対応の軽鎖)に最も相同であるヒト重鎖(対応の軽鎖)の1つを選ぶことにより、供与体免疫グロブリンからヒト化免疫グロブリンとなる際にはほとんどアミノ酸が変更されないであろう。それ故、且つ、ここでも理論に結びつけられなく、CDRの構造を歪ませるような CDR付近のアミノ酸の変化の機会が小さくなる。更に、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成るヒト化抗体の正確な全体的な形態は供与抗体の形態により近く類似することができ、これも CDRの歪みの機会を下げ

る。

典型的には、少なくとも約10~20種のヒト重鎖の代表的なコレクションにおける3~5つの最も相異なる重鎖可変領域配列のうち1つが、重鎖フレームワーク及び同様に軽鎖の提供される受容体として選ばれるであろう。好ましくは、1~3の最も相異なる可変領域のうち1つが利用されるであろう。選ばれる受容体免疫イムノグロブリンは最も好ましくは供与体免疫グロブリンに対してそのフレームワーク領域において少なくとも約85%の相同性を有するであろう。

多数のケースにおいて、ヒト化軽鎖及び重鎖が互いに好適に接し合うことを確実にするため、受容体配列として、同一の抗体に由来する軽鎖及び重鎖を利用することが好ましいと考えられる。この場合、その供与体の軽鎖及び重鎖は、その完全な配列が知られているヒト抗体、例えば Bu, Lay, Pom, Wol, Sie, Gal, Ou及び VERA抗体 (Kabatら、前掲；通常、ヒト抗体の最後の数個のアミノ酸は未知であり、従って別のヒト抗体との相同性によって推定されねばならない) に由来する重鎖に対してのみ比較される。軽鎖及び重鎖可変領域配列が共に、供与体の軽鎖及び重鎖可変領域配列と全体的に最も相同性であるヒト抗体が選ばれるであろう。選んだヒト抗体は軽鎖及び重鎖受容体配列の両方を提供するのである。実際、ヒトBu抗体がこの機能を果たすことがよく見出されている。

いかにしてドナー免疫グロブリンを選ぶかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のその位置のアミノ酸と同じなるようにヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選ぶことによって、より高い親和力を獲得することができる。第2の原理は、どのアミノ酸を供与体から選ぶかを規定する以下のカテゴリーである。好ましくは、これらのカテゴリーのうちの1つに属するほとんど又は全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸は事実上

選ばれるであろう。

カテゴリー1：CDRにおけるアミノ酸の位置は Kabatら、前掲に定義されている。

カテゴリー2：ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない（即ち「まれである」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト重鎖（対応の軽鎖）V領域配列の約20%以下、しかしながら通常は約10%以下しかその位置に存在しないアミノ酸を示す）場合、そしてその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である（即ち「一般である」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の約25%以上、しかしながら通常は50%以上の配列に存在するアミノ酸を示す）場合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるであろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、一般でないアミノ酸をたまたまヒト抗体に典型的である供与体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にすることができる。

全てのヒト軽鎖及び重鎖可変領域配列はそれぞれ、互いに対して特に相同性であり、且つ、一定の基準の位置 (Kabatら、前掲) にて同一のアミノ酸を有する配列の「サブグループ」に分類される。ヒト受容体配列中のアミノ酸がヒト配列の中で「まれ」又は「一般」であるかを決定するとき、受容体配列と同じサブグループにおけるそのヒト配列のみを考慮することがしばしば好ましいであろう。

カテゴリー3：ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つの CDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるであろう。それらのアミノ酸は、おそらく特に CDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体 CDRを最

適しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し (Amisら、*Science*, 233, 741-753 (1986))、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接触を維持するのに望ましいかもしれない。

カテゴリー4：典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の幾つかのアミノ酸が CDRに密接しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、疎水的相互作用等により CDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択され得る。この基準に従ったアミノ酸は、通常は CDR中の成る部位の約3人単位内に側鎖原子を有し、そして確立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従って CDR原子と相互作用することができる原子を含まなければならない。

水素結合を形成しうる原子の場合、この3人はその原子核の間で測定されるが、しかしながら結合を形成しない原子に関しては、この3人はそれらのファンデルワールス表面間で測定される。従って、後者の場合、相互作用が可能と考えられる原子に関して、その原子核は約6人以内（3+ファンデルワールス半径の合計）であろう。ほとんどの場合、原子核は4又は5~6人離れている。アミノ酸が CDRと相互作用できるかの決定のうえで、重鎖CDR2の最後の8個のアミノ酸を CDRの一部と考えることが好ましく、なぜなら構造上の見地より、これらの8個のアミノ酸はフレームワークの一部としてよりふるまうからである。

CDR中のアミノ酸と相互作用でき、そしてそれ故カテゴリー4に属するフレームワーク中のアミノ酸は別の方法で区別できる。各フレームワークのアミノ酸の溶剤の接近可能な表面積は2つの方法、

即ち、(1) 完全抗体において、及び(2) その CDRの除去された抗体より成る理論分子、において計算される。これらの値の間での約10平方人又はそれより大きい有意差は、フレームワークのアミノ酸の溶剤への接近が CDRにより少なくともある程度ブロックされ、そしてそれ故このアミノ酸が CDRと接触していることを示す。アミノ酸の溶剤接近可能表面積は、当業界において既知の計算法を利用して、抗体の3次元モデルに基づいて計算される（例えば Connolly の *J. Appl. Cryst.*, 16, 548 (1983) 及び Lee と Richards の *J. Mol. Biol.*, 55, 379 (1971)）。フレームワークのアミノ酸は、CDRと接触する別のフレームワークアミノ酸のコンホメーションに影響を及ぼすことによって CDR間接的に相互作用することも時折ある。

フレームワーク中のいくつかの位置でのアミノ酸、特に軽鎖の位置2、48、64及び71、並びに重鎖の26-30、71及び94（番号付けは Kabatら、前掲に従う）のそれは数多くの抗体 (Chothia と Lesk, *J. Mol. Biol.*, 126, 901 (1987)) と相互作用することができることが知られており、それ故これらのアミノ酸は一般にカテゴリー4に属するであろう。典型的には、本発明のヒト化免疫グロブリンはこれらに加えてカテゴリー4に属する（異なる）供与体アミノ酸を含むであろう。軽鎖における位置35、並びに重鎖における93及び103のアミノ酸も CDRと相互作用するようである。これらの番号の位置の全てでは、ヒト化免疫グロブリンとなるように受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸（それらが異なるとき）の選択が好ましい。他方、カテゴリー4に属しうる一定の位置、例えば軽鎖の最初の5個のアミノ酸が、ヒト化免疫グロブリンにおける親和力を失わずに受容体免疫グロブリンから時折り選ばれる。

Chothia と Lesk (前掲) は Kabatら (前掲) とは異なる CDRを決定している。特に、CDR1は26~32の残基数を含むと決定されている。

従って、Biochmannら（前掲）はこれらのアミノ酸を供与体免疫グロブリンから選んでいる。

タンパク質、例えば抗体のモデルを作るためのコンピュータプログラムは一般に入手でき、そして当業者によく知られている（Leryら、*Biochemistry* 23, 7168-7175 (1989)；Brucoleriら、*Nature*, 335, 564-568 (1988)；Chothiaら、*Science*, 233, 755-758 (1988)を参照のこと）。これらは本発明の一部を構成していない。事実、全ての抗体は類似の構造を有するため、ブルックヘブン蛋白質データバンクより入手できる既知の抗体の構造が、他の抗体の大まかなモデルとして必要ならば利用される。市販のコンピュータプログラムは原子間の距離を計算するため、及び異なるアミノ酸が相互作用する傾向を評価するため、これらのモデルをコンピュータモニターに表示するのに利用できる（Perrinら、*J. Mol. Graphics*, 6, 13-27 (1988)を参照のこと）。

ヒト化免疫グロブリンにおけるアミノ酸を供与体から取る場合を記載した上記のカナブリーに加えて、ヒト化免疫グロブリンにおける一定のアミノ酸は、もしそれらが下記に属するなら、供与体又は受容体以外から取ることができる：

カテゴリー-5：供与体免疫グロブリン中の一定の位置のアミノ酸が前記で定義したようにヒト配列にとって「まれ」であり、且つ、受容体免疫グロブリン中のその位置でもそのアミノ酸が「まれ」であるなら、ヒト化免疫グロブリン中のその位置でのアミノ酸はヒト配列の「典型的」ないくつものアミノ酸となるよう選ばれうる。好ましい選択は受容体配列と同じサブグループに属する既知のヒト配列において知られているその位置にてよく存在しているアミノ酸である。

ヒト化抗体は一般に、ヒトの治療における利用に関して、マウス

よりも、又はある場合においてはキメラ抗体よりも少なくとも3つの有用な利点を有している：

1) エフェクター領域がヒトであるため、これはヒト免疫系の他の部分によく相互作用する（例えば、補体-依存性細胞障害性(CDC)又は抗体-依存性細胞障害性(ADCC)によって腫瘍細胞をより効果的に破壊する）。

2) ヒト免疫系は異物のようにヒト化抗体のフレームワーク又は定常領域を認識せず、従って注射した抗体に対する抗体応答は、全体的に外来性であるマウス抗体又は部分的に外来性であるキメラ抗体に対するそれより低いであろう。

ある観点において本発明は、受容体ヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結された、所望の抗原、例えばヒトIL-2受容体に結合することのできる供与体免疫グロブリンに由来する重鎖及び軽鎖 CDRをコードする超換 DNAセグメントを発見せしめることによって生産されるヒト化免疫グロブリンの設計に関する。本発明に従って設計された例示的な DNA配列は、図1〜4に示す重鎖及び軽鎖 CDRと実質的なヒトフレームワーク領域を含んで成るポリペプチド鎖をコードする。コドン縮減及び重要でないアミノ酸置換に基づき、下記に詳細のとおり、その他の DNA配列がこれらの配列に容易に代わることができる。一般に、本発明の基準は実質的に任意のヒト化免疫グロブリンを設計するのに有用である。

前記 DNAセグメントは、典型的には、ヒト化免疫グロブリンのコード配列に作用可能に連結した発現調節 DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。

ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖二重体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の収得および精製を行うことができる（S. Boychokの Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979)を参照のこと）。

ヒト定常領域 DNA配列は、周知の方法に従って、種々のヒト細胞から、好ましくは不活化されたB細胞から単離することができる（Kabat、前掲および WP 87/02671を参照のこと）。本発明の免疫グロブリンを作製するための CDRは、所望の抗原（例えばヒトIL-2レセプター）に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして誘導され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。定常領域及びフレームワーク DNA配列の適当な起源細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる（"Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.）。

本明細書中に特定の記載のヒト化免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同の」改良免疫グロブリンを容易に設計することができる。そして当業者は周知の種々の超換 DNA技術を使って製造することができる。例えば、フレームワーク領域は幾つかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図1〜図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト化免疫グロブリンを基準として、種々の異なるヒトフレームワーク領域を単独または組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の修

飾は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発（Gilliesおよび Smith, *Gene* 51: 81-97 (1979)並びに Robertsら、*Nature* 328: 731-734 (1987)を参照のこと）により容易に達成することができる。実質的に相同の免疫グロブリン配列は対照の免疫グロブリンタンパク質と少なくとも約85%の相同性、通常は少なくとも90%、そして好ましくは少なくとも約95%の相同性を示すものである。

あるいは、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫グロブリン活性（例えば補体結合活性）を有する。これらのポリペプチド断片は当業界に周知の方法による完全抗体のタンパク質分解により製造するか、又は部位特異的突然変異誘発を利用して停止コドン在所望の位置、例えばC81の後に挿入して Fab断片を作るか、もしくはヒンジ領域の後に挿入して (Fab')₂断片を作ることができる。一本鎖抗体はVL及びVHを DNAリンカーにつなげることによって製造できる（Houstonら、前掲及び Birdら、前掲を参照のこと）。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの機能性領域（例えば酵素；1987年12月15日提出の一般開示されたU.S.S.P. 132,387を参照のこと）と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質（例えば免疫毒素）を製造することができる。最終的に所望のヒト化抗体を発見することができる本発明の試験配列は、種々異なるポリヌクレオチド（ゲノムまたは cDNA, RNA、合成オリゴヌクレオチド等）および成分（例えばV、J、DおよびC領域）から、そして種々異なる技術により、形成せしめることができる。適当な合成及びゲノム配列を連結することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい（ヨーロッパ特許公開No 0239400およびL. Reichman, ら、*Nature*

332: 323-327 (1987)を参照のこと。

前に述べたように、該 DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した（即ち、機能を保証するように配置させた）後で該配列が宿主中で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソードとしてまたは宿主染色体 DNAの組み込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望の DNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシンのそれを含むだろう（例えば、米国特許第 4,704,362号を参照のこと）。

大腸菌 (*E. coli*) は本発明の DNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バシラス属、例えばバシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、並びに他の腸内細菌、例えばサルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*) および種々のシュードモナス属 (*Pseudomonas*) 種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列（例えば複製開始点）を含むであろう発現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、 β -ラクタマーゼプロモーター系、または λ ファージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。サッカロミセス (*Saccharomyces*) は好ましい宿主であり、発現調節配列、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖酵素プロモーターを含むプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結

配列等を有する適当なベクターを有している。

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる (Wisonacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987) を参照のこと)。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際は真核細胞が好ましい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、種々の COS細胞系、HeLa細胞、好ましくはミエロマ細胞系等及び形質転換されたB細胞またはハイブリドーマが挙げられる。それらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー (Queen, C. ら, *Immunol. Rev.* 89: 49-68 (1985))、および必要ならプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス等に由来するプロモーターである。

特定の DNAセグメント（例えば、重複および軽鎖コード配列並びに発現調節配列）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される（一般には、Maniatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982) を参照のこと）。

一度発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、種々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当業界の標準法、

例えば硫酸アンモニウム沈澱、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる（一般的には、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと）。少なくとも約90-95%均質の實質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98-99%またはそれ以上の均質が医薬用途に好ましい。部分的にまたは所望の時には均質まで精製されれば、原法的に（体外的を含む）またはアッセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実施する際に該ポリペプチドを使用することができる（一般的には、*Immunological Methods*, 第1および2巻, LefkovitsおよびPernis編, Academic Press, New York, N.Y. (1979および1981) を参照のこと）。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫毒素における1又は複数の当該抗体の使用を含んで成る。免疫毒素は2つの成分により特徴づけられ、そして試験管内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー-賦形剤」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は種々の周知の化学的方法のいずれかによって一緒に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫毒素の製造が当業界で周知であり、例えば"Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpeら, *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, 168-190 (1982) 中に見つけることができる。該成分は遺伝子的に結合させることもできる (Chaudharyら, *Nature* 339, 394 (1989) 参照)。

種々の細胞毒性物質が免疫毒素における使用に適当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-186 およびビスマス-212 又はその他のアルファ線放射物；多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシンおよびシスプラチン；並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質機アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス外毒素A、リシン、ジフテリ毒素、リシンA鎖等；または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素（例えばホスホリパーゼC）を挙げることができる。（1990年7月26日に提出された WO 90/07861；"Choleric Toxins", OlsnessおよびPhil, *Pharmac. Ther.*, 25: 355-381 (1982)；並びに"Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", BaldwinおよびByrne編, 159-179, 224-266頁, Academic Press (1985) を参照のこと。）

免疫毒素のデリバリー成分は、本発明のヒト化免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えば Fabが使用される。典型的には、免疫毒素中の抗体はヒト IgGまたは IgG1タイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物正常恒産を用いることもできる。

ヒト化抗体およびその医薬組成物は、特に非経口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。非経口投与用組成物は、通常、許容される量、好ましくは水性担体中に溶解された免疫グロブリンの溶液または混合物を含んで成るだろう。種々の水性担体、例えば水、緩衝化された水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等を使用することができる。それらの溶液は無菌であり、通常は粒状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の調製技術により調製することができる。該組成物は、適切な生理的条件に必要であ

る時は医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、ヒトアルブミン等を含有することができる。それらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に渡り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5%未満から、通常は少なくとも約1%から、15~20重量%ほどまでに及ぶことができ、そして液体の体積、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

従って、注射用の典型的医薬組成物は、1mlの無菌緩衝液と1~10mgの免疫グロブリンを含むように調整することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガー液と150mgの抗体を含むように調整することができる。非経口投与可能な組成物の実際の調製方法は当業者に既知であるかまたは明白であり、そして例えばRemington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は貯蔵のために凍結乾燥することができ、そして使用前に適当な阻体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で既知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらし得ること（例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある）、そして使用レベルを調整して適切な合わせなければならないことがあることは、当業者に明白であろう。

本発明のヒト化抗体またはその混合物を含有する組成物は、予防および/または治療処置のために投与することができる。治療用

途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の重症度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1~約200mgの抗体、より好ましくは患者あたり5~25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状状態、即ち命にかかわるかまたはもしかすると命にかかわる状況において使用されるだろうことを念頭に置かなければならない。そのような場合、本発明のヒト化抗体により達成される外来性物質の最小化および「外来物質」拒絶の低確率の点からみて、実質的過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療医により望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本免疫グロブリンまたはその混合物を含有する組成物は、患者の抵抗力を高めるためにまだ病状でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の健康状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1~25mgであろう。

1回又は数回の本組成物の投与は処置する医師により選択される用量レベル及びパターンに従って実施される。あらゆる状況において、該医薬調整剤は患者を有効に処置せしめるのに十分な量の本発明の抗体を提供すべきである。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト化抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵

素阻害剤、リガンド（特にハプテン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

以下の実施例を限定でない例示の目的のために提供する。

5つの特定のヒト化抗体の製造を以下に説明する。これらの抗体は、ヘルペス単純ウイルスのgB及びgD糖タンパク質(Hatcalifら、*Intervirology* 29, 39 (1988))にそれぞれ結合するPd79及びPd138-80、CD33抗原に結合するH195 (Taniotoら、*Leukemia* 3, 339 (1989))、IL-2レセプターのp75鎖に結合する α ik- β 1 (Tsudaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1982 (1989))、並びにサイトメガロウイルスのgB糖タンパク質に結合するCN75である。

基本的には、各抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAは、アンカー化ポリメラーゼ連鎖反応(Lobら、*Science* 243, 219 (1989))により、定常領域にハイブリダイズし、且つ、Hind III部位を含んでいる3'プライマーと、dGテールにハイブリダイズし、且つ、EcoRI部位を含んでいる5'プライマーを利用してクローンした（図6において手法を示す）。シーケンシングのため、このPCR増幅化断片をEcoRI及びHind IIIによって消化し、次いでpUC18ベクターの中にクローンした。各抗体に関して、少なくとも2本の重鎖及び2つのカッパクローンをシーケンス化し、そして同一の配列を有していることが認められた。成熟の軽及び重鎖可変領域の推定アミノ酸配列を図1~5の上行に示す。

ヒト化抗体の高い結合親和力を維持するため、抗体を設計するときには前記の原理及びカテゴリーを採用した。高い配列相関性に基づき、マウス抗体に受容体の軽及び重鎖ヒトフレームワークの両方を提供するのに以下のヒト抗体を選択した：Pd79のためにヒトPos、Pd138-80のためにヒトEu、H195のためにヒトEu、 α ik- β 1のため

にヒトLay、そしてCN75のためにヒトWol。

各マウス抗体の可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラム ABNOV及び BNCAD (Levittの *J. Mol. Biol.*, 168, 595 (1983))及びZiblerら、*Biochemistry* 29, 10032 (1990))を用いた。このモデルは、CDRに十分に密着してそれらと有効に相互作用する各フレームワーク中のアミノ酸を決定するために利用した。各抗体に関して、前記のカテゴリー(1)~(5)に属することが認められた位置を、図1~5の番号付けに従い、表1に示す。

表 1

Pd79抗体	
カテゴリー	軽 鎖 重 鎖
1	24-38, 54-50, 93-100 31-35, 50-66, 99-111
2	9, 45, 46, 83 82, 112
3	53 112
4	53 97
5	81

Pd138-80抗体	
カテゴリー	軽 鎖 重 鎖
1	24-34, 50-56, 89-97 31-35, 50-66, 99-110
2	48, 63 93, 98, 111, 112, 113, 115
3	-- 30, 67, 98, 111
4	36, 48, 87 27, 30, 37, 48, 67, 68, 98

表 1 (続き)

H195抗体

カテゴリー	軽 鎖	重 鎖
1	24-38, 54-60, 93-101	31-35, 50-66, 95-105
2	10, 52, 67, 110	93, 95, 98, 106, 107, 108, 110
3	--	30, 67, 98, 106
4	40, 52, 74	27, 30, 48, 68, 98

mk- β 1抗体

カテゴリー	軽 鎖	重 鎖
1	24-33, 49-55, 88-96	31-35, 50-65, 98-108
2	13	84, 89, 90
3	--	30, 49
4	70	29, 30, 72, 73
5	41	1

CHV5抗体

カテゴリー	軽 鎖	重 鎖
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-108
2	--	69, 80
3	49	30
4	49	24, 27, 28, 30, 97
5	--	5

各ヒト化抗体を設計するうえで、その位置が、マウス供与体配列に由来するアミノ酸を用いる場合であるカテゴリー(1)-(4)に属しない限り、又はその位置においてヒト配列にとって典型的なアミノ酸を利用する場合であるカテゴリー(5)に属しない限り、ヒト受容体配列のアミノ酸と同じになるそれを各位置に選択した。

のカラムに通すことによって抗体を精製した。結合した抗体を0.2 Mのグリシン-HCl、pH 3.0で溶離させ、そして1 Mのトリス、pH 8.0で中和した。PD10カラム(ファルマシア)に通すことによって緩衝液をPBSに交換した。

ヒト化抗体の、対応の抗原を発現するタイプの細胞への結合性を試験した：Pd79及びPd138-80に対するHSV-感染化細胞、H195に対するU937細胞、mk- β 1に対するVTJ8細胞及びCHV5に対するCHV-感染化細胞。蛍光比色法により、ヒト化抗体は元のマウス抗体及び関連のキメラ抗体とほぼ同程度に結合した。更に、ヒト化抗体は細胞に対する結合に関して、関連のマウス抗体とほぼ同程度に放射線標識化マウス抗体に対して結合し、従ってこのヒト化抗体はマウス抗体とほぼ同じ結合親和力、典型的には約2倍以内又はそれより優れた親和力を有する(例えば表2を参照のこと)。

表 2

マウス及びヒト化抗体の結合親和力

	マウス K _d (M ⁻¹)	ヒト化 K _d (M ⁻¹)
Pd79 (抗-gB)	1.1×10 ⁶	5.3×10 ⁶
Pd138-80 (抗-gD)	5.2×10 ⁷	4.8×10 ⁷

以上より、本発明のヒト化免疫グロブリンは他の抗体よりも数多くの利点を提供することが認められる。他のモノクローナル抗体と比べ、本ヒト化免疫グロブリンはより経済的に生産でき、そして実質的に少ない外来性アミノ酸残基を含む。ヒト患者に注射された後のこの低められた抗原性の傾向は有意な治療改善を示す。

各ヒト化免疫グロブリンの詳細な説明を続ける。

ヒト化抗体についての遺伝子の作製のため、ヒト化重鎖及び軽鎖のタンパク質配列をコードし、マウス抗体に典型的に由来するシグナルペプチドを含み、マウス配列において見いだせるコドンを一様に利用するヌクレオチド配列を選択した。制限部位を作るため、又は希望されないものを除去するため、制限の縮小コドンを変化させた。このヌクレオチド配列は更に免疫グロブリン遺伝子にとって典型的なスプライスドナーシグナル及び各端にてXbaI部位を含む。各可変ドメイン遺伝子に関して、交互の鎖の上の2対の重複オリゴヌクレオチド配列全体並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナルを包括するものを合成した。このオリゴヌクレオチドはApplied Biosystems 380B DNA合成装置で合成した。各オリゴは約110-140塩基の長さであり、15-20塩基の重複を有する。二本鎖DNA断片は、各対のオリゴヌクレオチドから、クレノウもしくはTaqポリメラーゼ、又はシーケナーゼにより合成し、制限酵素により消化し、pUC18ベクターの中にリゲートし、そしてシーケンス化した。それぞれ正確な半配列を有する2本の断片を次にpVg1 (Pd79及びPd138-80の重鎖)又はpVg1-dhfr(H195, mk- β 1, CHV5の重鎖)又はpVH(全ての軽鎖)の発現ベクターのXbaI部位へ、完全な重鎖及び軽鎖遺伝子を作るのに適切な方向においてリゲートさせた。反応は当業界に周知の条件のもとで実施した(Hanlonら、前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによりSp2/Oマウスミエロマー細胞へとトランスフェクトし、そしてcsp発現に関する細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによってクローンをスクリーンし、次いで、優良の生産性クローンから抗体を精製した。組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテインAセファロースCL-4B(ファルマシア)

例 1

p75に対するヒト化免疫グロブリン

哺乳動物において、免疫応答は外来物質、即ち、抗原に特異的に相互作用する2タイプの細胞により媒介される。これらの細胞タイプのうちの1つ、B-細胞は、抗体の生産のもととなる。第2の細胞のクラス、T細胞は、両B細胞の生体内機能を調節する広範囲にわたる細胞サブセット及びT細胞を含んでいる他の広範囲にわたる造血細胞を含む(一般に、Paul, W.B.編、*Fundamental Immunology* 第2版、Raven Press, New York (1989)を参照のこと)。

T細胞がこの調節を及ぼす経路は、インターロイキン-2(IL-2)として知られ、もとはT-細胞成長因子と呼ばれていたリンホカインの生産を介する。IL-2の主機能はT細胞の刺激及び維持にあるようである。事実、数人の免疫学者はIL-2が全免疫応答の中心にあると信じている(Parron, J.ら、*Immunol. Rev.* 53, 129-166 (1982))。

その生物学作用を及ぼすため、IL-2は特定の高親和力膜レセプターに相互作用する(Greene, W.ら、*Progress in Hematology X19*, E. Brown編、Grune and Stratton, New York (1986)、頁283ff. 及びWaldmann, *Ann. Rev. Biochem.* 58, 875 (1989))。ヒトIL-2レセプターは複雑な多量体タンパク質であり、その一鎖は、Tacペプチド又はアルファ鎖として知られ、約55kDのサイズである(Leonard W.ら、*J. Biol. Chem.* 260, 1872 (1985)を参照のこと)。この第2鎖はp75又はベータ鎖として知られている(Iacodora, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83, 9694 (1986) 及びSharonら、*Science* 234, 859 (1986))。p75又はTac鎖及びp75鎖はそれぞれ独立して低又は中親和力でIL-2と結合し、一方両鎖のIL-2レセプター複合体は高親和力でIL-2と結合する。ヒトIL-2レセプターの

p75はしばしば本明細書中でp75タンパク質と簡単に呼ばれている。

ヒトIL-2レセプターの構造及び機能の説明のほとんどは特異的な反応性のモノクローナル抗体の開発に基づく。特に、抗-Tacとして知られているあるマウスモノクローナル抗体 (Uchiyamaら, Immunol. **126**, 1393 (1981)) は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単核マクロファージ科の細胞、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞、そしてむしろ活性化T-細胞上でも検出されうることを示すために利用されている。重要なこととして、休止T-細胞、B-細胞又は循環マクロファージは典型的にはIL-2レセプターを示さない (Harrmanら, J. Exp. Med. **162**, 1111 (1985))。他の抗体、 α ik- β 1はp75鎖に結合する (Taudoら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **89**, 1982 (1989))。

抗-Tacモノクローナル抗体もIL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を決定するために利用されており、そして細胞培養物中に細胞障害性及び抑制Tリンパ球を発生せしめることを含む様々なT-細胞機能を阻害することが示されている。更に、抗-Tac及びその他の抗体による試験に基づき、様々な疾患、特に成人T細胞白血病が、T細胞による不適切なIL-2レセプター発現に現状関連している。

より最近になり、IL-2レセプターはT細胞により媒介される障害への新規の治療手法に関する真の標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体又は α ik- β 1は、IL-2レセプターを抱える細胞を効率的に除去するために単独で、又は免疫コンジュゲート (例えばリシンA、アイソトープ等との) として利用されることが提唱されている。これらの因子は病状に関与する例えばIL-2レセプター発現性白

血病細胞、一定のB-細胞、又は活性化T-細胞を理論的に消失させ、且つ、必要とされる正常なT-細胞免疫応答を高めることができることを確実にするために成熟正常T-細胞及びその前駆体の維持を可能とすることができる。一般に、ほとんどのその他のT-細胞特異的因子は本質的に全ての未熟T-細胞を破壊してしまうことができ、これはこの因子の治療効果を制限する。全体的に、IL-2レセプターに対して特異的な適当なモノクローナル抗体の利用は活性化T-細胞による自己免疫障害、器官移植及び任意の望ましくない応答において治療的用途を有しうる。事実、例えば抗-Tac抗体を利用する臨床試験が開始されている (Kirkmanら, Transplant. Proc. **21**, 1766 (1989) 及びWaldmannら, Blood **72**, 1805 (1989))。

残念ながら、抗-Tac、 α ik- β 1及びその他の非ヒトモノクローナル抗体の利用は、特に以下に説明するような反復治療法において一定の欠点を有している。例えばマウスモノクローナル抗体は一般にヒト補体を完全に固定しなく、そしてヒトに利用する際のその他の重要な免疫グロブリン機能特性を欠く。おそらくより重要には、抗-Tac、 α ik- β 1及びその他の非ヒトモノクローナル抗体は、ヒト患者に注射されたときに免疫原となりうる大きなアミノ酸の鎖を含まない。

本発明に従い、ヒトIL-2レセプターのp75鎖に特異的に反応性なヒト免疫グロブリンを提供する。少なくとも 10^{-7} ~ 10^{-8} M⁻¹、そして好ましくは 10^4 M⁻¹~ 10^{10} M⁻¹又はそれより強力な結合親和力を有する免疫グロブリンは例えばIL-2のヒトIL-2レセプターへの結合を阻害することができる。該ヒト免疫グロブリンはヒト骨髄フレームワークを有し、そして免疫グロブリン、典型的にはp75タンパク質上のエピトープに特異的に反応性なマウス免疫グロブリンに由来する相補性決定領域(CDR)を有することができる。大

量に経済的に生産できる本発明の免疫グロブリンは例えば様々な技術によるヒト患者におけるT細胞媒介障害の処置において利用できる。

一観点において、本発明はヒトIL-2レセプター上の所望のエピトープに結合可能な免疫グロブリン、例えば α ik- β 1モノクローナル抗体に由来する量及び/又は軽鎖CDRをコードする組換えDNAセグメントに関する。これらの領域をコードするDNAセグメントは典型的には適当なヒト骨髄フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。発現により α ik- β 1の量及び軽鎖CDRを含んで成るポリペプチド鎖をコードする典型的なDNA配列を図7に含ませている。コドン簡潔及び重要でないアミノ酸置換に基づき、前記した通りその他のDNA配列が容易にそれらの配列にとって代わることができる。

これらの抗体は典型的には各別にT細胞媒介障害症状の処置において利用されるであろう。一般に、障害に関連する細胞がIL-2レセプターを抱えていることが同定されたとき、IL-2のヒトIL-2レセプターへの結合を阻害できるヒト抗体が適切となる (U.S.S.P. 085,707、題名 "Treating Human Malignancies and Disorders" を参照のこと)。例えば、処置に適する典型的な障害症状には、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の器官移植を受けた患者における移植対宿主障害及び移植拒絶が含まれる。その他の疾患には、自己免疫障害、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ型関節炎、全身性エリテマトーデス及び重症筋無力症が含まれる。

本発明のヒト抗体は別の抗体と、特に疾患のもととなる細胞上の別のマーカーに反応性なヒトモノクローナル抗体と組合せて利用することもできる。例えば、適当なT-細胞マーカーにはファーストインターナショナル リューコサイト ディフォレンチエーシ

オン ワークショップの Leukocyte Typing, Bernardら編, Springer-Verlag, N.Y. (1984) により命名された通称「クラスターの分類」に分類されたものが含まれる。好ましい利用はp55に結合するヒト抗体とIL-2レセプターのp75に結合するヒト抗体、即ち、ヒト化抗-Tac+ヒト化 α ik- β 1による患者の同時処置である。

本発明のヒト抗体は試験管試験において広範囲にわたる用途が更に見出せうる。例えば、該抗体はT細胞の分類、特定のIL-2レセプター保有細胞もしくはレセプターの断片の単離、ワクチンの製造等のために利用できる。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応により (E.B. Lobら, Science **243**, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、Hind III 部位を含む3' プライマーと、dGチールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI 部位を含む5' プライマーを用いてクローニングする (図6において手法を示す)。このPCR増幅化断片をシーケンシングのためにEcoRI及びHind IIIにより消化し、次いでpUC19ベクターの中にクローニングした。 α ik- β 1に関しては、2種類のガンマー2 α 特異性及び2種類のクッパー特異性クローンをシーケンス化した。この2つのガンマー2 α クローン及び2つのクッパークローンはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図7に示す。

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミドpVg1-dhfr (図8A) はヒトサイトメガロウイルス (H) プロモーター及びエンハンサー (B. Bocharら、

Cell 41, 521 (1985)), 前方のイントロンの一部を含むヒトゲノム C ϵ 1 セグメント、並びに選別のためのジヒドロフェレートリダクターゼ (dhfr) 遺伝子 (Simonsen ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2493 (1983)) を含む。プラスミド pVK (図 8B) は pVal-dhfr と類似するが、しかしながらヒトゲノム C ϵ 1 セグメント及び apt 遺伝子を含む。mik- β 1 の重鎖及び軽鎖可変領域の誘導体をポリメラーゼ連鎖反応により cDNA から調製した。5' プライマーは ATG コドンにおいて出発する V 領域にハイブリダイズしており、そして XbaI 部位を含む; 3' プライマーは J 領域の最後の 15 個のヌクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及び XbaI 部位を含む (C. Queen ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 10029 (1988) を参照のこと)。改変 V 領域に関連するプラスミドベクターの CNV プロモーターと定常領域の部分イントロンとの間の XbaI 部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー類プラスミドをエレクトロポレーションによって Sp2/0 マウスミエロマ細胞にトランスフェクトし、そして apt 発現のために細胞を選別した。最大量の完全抗体を分泌するクローンを ELISA により検定した。精製したキメラ mik- β 1 抗体は、フローサイトメトリーにより、p75 抗原を発現する YTF8 細胞に結合することが示された (図 9)。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queen らの一般手順に従った (C. Queen ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 10029 (1988))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相溶性であるに従い、ネズミ CDR をヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低めよう。CDR への送りの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供

するために選び、これによりこの 2 本の鎖を合成するうえでの非適合性の可能性は低まる。配列データベース (Micro Genie Sequence Analysis Software (Beckman) により実施) に基づき、抗体 Lay を、mik- β 1 のヒト化のためのフレームワーク配列を組むために選んだ。

mik- β 1 可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラム EXCAD (H. Levitt, J. Mol. Biol. 162, 595 (1983)) を用いた。このモデルは、CDR に十分に密接していてそれらと有効な相互作用する mik- β 1 フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた (以下のカテゴリー 4)。ヒト化軽鎖及び重鎖 mik- β 1 可変領域を設計するには、次の 5 つのカテゴリーのうちの 1 つ又は複数を画しない限り、各位置において Lay 抗体と同一のアミノ酸を選択した:

(1) その位置が CDR に属した。

(2) その位置では、Lay アミノ酸がヒト抗体にまれであり、一方、その位置では、mik- β 1 アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。

(3) その位置が CDR のすぐ近くであった。

(4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域 (CDR) に物理的に近いことを示唆した。

これらのカテゴリーのうちのいくつかの位置に関しては、(マウス) mik- β 1 抗体由来のアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、第 5 カテゴリーに属する

(5) その位置では Lay アミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そして mik- β 1 アミノ酸が異なり、しかもまれである。この場合、その位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリーにおけるアミノ酸を表 3 に示す。いくつかのアミノ

酸は複数のカテゴリーに属しうる。ヒト mik- β 1 の軽鎖及び重鎖可変ドメインの最終配列を図 10 に示し、Lay 配列と比較する。

表 3

カテゴリー	軽 鎖	重 鎖
1	24-33, 49-55, 88-96	31-55, 50-65, 98-108
2	13	84, 89, 90
3		30, 49
4	70	29, 30, 72, 73
5	41	1

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、マウスの mik- β 1 鎖中と同一のシグナルペプチド (図 7) を含むヒト化重鎖及び軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選別した。複数の縮小コドンを変えて、制限部位を作る又は所望されないものを除去した。このヌクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同一スプライスドナーシグナル及び各端での XbaI 部位も含んでいた。各遺伝子を 4 つの重複合成オリゴヌクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互順上の 2 対の重複オリゴヌクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナル (図 11) を含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアプライドバイオシステム 380B DNA 合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 の塩基の長さであり、その約 20 塩基は重複していた。各対のオリゴヌクレオチドから二本鎖 DNA 断片をシーケナーにより合成し、制限酵素で消化し、ブルースクリーン II ES (+) (Stratagene) ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの 2 種の断片を次に pVal-dhfr 又は pVK 発現ベクターの XbaI 部位にリゲートした。試験管内突然変異誘

発を利用し、ヒト化重鎖の位置 1 にて (図 10B) スクレオチド CT を AG に変えることにより、オリゴヌクレオチド wps54 により本家コード化される Ala のアミノ酸を Glu (E) に変えた。反応は当量界によく制御される条件のもとで行った (Maniatis ら, 前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって Sp2/0 マウスミエロマ細胞にトランスフェクトし、そして apt 発現のために細胞を選別した。ELISA によって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーンし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテイン A-セファロース CL-4B (ファルマシア) のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を 0.2M のグリシン-HCl、pH 3.0 により溶離させ、次いで 1M のトリス、pH 8.0 で中和した。この緩衝液を PD10 カラム (ファルマシア) に通して PBS に交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化 mik- β 1 抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。該ヒト化抗体は、p75 鎖を高レベルで発現する YTF8 細胞に、フルオロサイトメリー分析においてキメラ抗体と同様に結合し (図 9)、これが同じ p75 タンパク質を認識することが示唆された。

ヒト化抗体の親和力は放射線ヨウ素化マウス mik- β 1 抗体との結合によって決定した (図 12)。結合親和力は Berzofsky の方法に従って計算した (J. A. Berzofsky と J. J. Berkower の, Fundamental Immunology (W. E. Paul 編), Raven Press (New York), 595 (1984))。ヒト化 mik- β 1 抗体の結合親和力はマウスの mik- β 1 抗体の親和力の約 2 倍以内であった。

ヒトリンパ球の IL-2 刺激増殖を阻害する、ヒト化 mik- β 1 + ヒト化抗-Tac 抗体の能力 (1990 年 6 月 26 日公開の WO 90/07861

を参照のこと)を開発。フィコールバーク(ファルマシア)による遠心によりヒト血液から集めたヒト単球細胞を、RPMI培地+10%の胎児牛血清(FCS)の中に 2×10^6 細胞/mlに希釈した。1/200容量のフィトヘマグルチニンP(ジフコ)を加え、次いでこの細胞を4日間インキュベートした。この細胞をRPMI+10%のFCS+10 μ g/mlのIL-2の中で更に4日間インキュベートした。10 μ g/mlのPHA活性芽細胞を次に96穴プレートのウェルにおいて150 μ lのRPMI+10%のFCSの中で1時間、ヒト化 mix- β 1及びヒト化抗-Tac それぞれ2 μ gを伴って、又は伴わないで、これに50 μ lの培地中の種々の希釈率のIL-2(Amgen)を加えてインキュベートした。この細胞を48hrインキュベートし、0.5 μ Ciのメチル- 3 H-チミジン(Amersham, 82Ci/ μ mol)を加え、そしてこの細胞を24時間インキュベートした。この細胞を細胞ハーベスターで集め、そして放射活性を測定した。抗体の組合せはIL-2に反応する細胞の増殖を大いに阻止し(図13)、抗体の組合せが強い免疫抑制特性を有することが示唆された。ヒト化 mix- β 1とヒト化抗-Tacを合わせることは、いづれの抗体単体よりも強力に増殖を阻害した。

例 II

HSV抗原に対するヒト化免疫グロブリン

I型及びII型ヘルペスウイルス(HSV-1及びHSV-2)は現在、世界中での性的伝染障害の2番目に多い原因と考えられている。完璧に正確なデータは入手していないが、感染人は米国の人口の約20~40%に陥ると見込まれる。無症候性から生命を脅かす数多くの障害にHSV感染が関係している。特定の臨床的感心の中で、HSV-1感染由来の脳炎及び妊婦からその胎児へのHSV-2伝染がしばしば致命的である。免疫抑制患者もこのウイルスに感染したときに重症な合併症にかかる。

これらの免疫グロブリンは例えばHSV感染から細胞を守ることができる。該ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくはgB及びgDタンパク質のようなHSVタンパク質と反応性な免疫グロブリンに由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を有するであろう。大量に経済的に製造される本発明の免疫グロブリンは例えば種々の技術によるヒト患者におけるHSV媒介障害の処理において有用である。

HSVは全てのウイルスのうちの最もよく研究されているものであり、そしてHSVヒリオン構造は約33種のタンパク質を含むことが示されている。これらのタンパク質、特に8種の表層タンパク質(例えばgB, gC, gD, gE, gG, gH及びgL)に反応性のモノクローナル抗体に由来するCDRを利用するヒト化免疫グロブリンは本発明の好ましい態様を示す(Spear, P.G., *The Herpesviruses*, 第3巻、頁315-356 (1984)(Roizman, B., 編)、Plenum Press, N.Y., N.Y., 及びSpear, P.G., *Immunology of Viruses: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*, 頁425-446 (1985)(Neurath, A.R., 編)(Amsterdam: Elsevier)を参照のこと)。

ある観点において、本発明はHSVタンパク質の所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばHSVのgB及びgDタンパク質に反応性のモノクローナル抗体に由来する重鎖及び/又は軽鎖をコードする超塩基 DNAセグメントに関連する。このような領域をコードするDNAセグメントは一般に適当なヒト化フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。モノクローナル抗体Fd79及びFd138-80に由来する重及び軽鎖超塩基領域(ヒトフレームワーク領域を伴う)を含んで成るポリペプチド鎖をコードする典型的なDNA配列を図14に示す。コドン縮重及び重要でないアミノ酸置換に差つき、以下に詳しく述べ3通り、その他

HSV感染細胞において50種以上のHSVポリペプチドが同定されており、それには少なくとも7種の主要細胞表面糖タンパク質が含まれる(Virology Fieldら編、第2版、Raven Press, N.Y., N.Y., (1990)のWhitley, R.の第65章及びRoizmanとSearsの第65章、を参照のこと)。これらの糖タンパク質の特異的な生物学的機能はあまりよく解明されていないが、しかしながらgB及びgDは細胞融合活性に関与することが示されている(W.Calra, J. Virol., 52, 2596 (1988)及びFullerとSpear, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5454 (1987))。gB及びgDは種特異的及び種共通の抗原決定基の両者を発現する。OakesとLambはgB及びgEに対するモノクローナル抗体が、三叉神経節におけるHSV-1の複製を抑制することを実証した(OakesとLamb, J. Virol., 51, 856 (1984))。Dixらは抗-gC及びgD抗体が急性ウイルス肺炎性神経障害からマウスを守ることを示した(Dixら, Infect. Immun., 51, 192 (1983))。Whitleyとその仲間らはHSV-1に対するネズミモノクローナル抗体のパネルを作製し、そしていくつかの抗体がウイルスによる目の感染による盲疾及び死からマウスを守ることを示している(Kogaら, Virology 151, 385 (1986); Hotcalfら, Cur. Eye Res., 5, 173 (1987)及びHotcalfら, Intervirology 22, 39 (1989)を参照のこと)。クローンFd79(抗-gB)はたとえ免疫化が感染して48時間まで遅れても盲疾を防いだ。Fd79及びFd138-80(抗-gC)は上皮角膜炎の重症度を有意に引き下げ、そして異性交配マウスモデル中の持続性ウイルス感染の頻度を低めた。

本発明に従い、HSV関連エピトープと、このウイルス上に直接的に又は感染化細胞に特異的に反応性なヒト化免疫グロブリンを提供する。少なくとも 10^4 M $^{-1}$ 、そして好ましくは 10^4 M $^{-1}$ ~ 10^{10} M $^{-1}$ 又はそれより強力なHSV特異的抗原に対する結合親和力を有するこ

のDNA配列がこれらの配列に容易にとって代わることができる。

本発明の任意のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特に種々のHSV抗原に反応性のヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適当なHSV抗原にはgC, gE, gF, gG及びgHが含まれる(Rector, J.ら, Infect. Immun., 38, 168 (1982)及びFullerら, J. Virol., 63, 3435 (1989)を参照のこと)。

これらの抗体はアシクロビル又はその他の抗ウイルス剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用されうる。典型的にはこの試薬にはイドクスウリジン又はトリフルオロチミジンが含まれるが、しかしながらHSV処置についての業界の当業者によく知られている莫大な数の添加剤(例えばビガラピン)も利用されうる(Corey, I. 前掲を参照のこと)。本発明の好ましい薬品製剤はHSVにより感染された細胞を殺す免疫毒性の対症免疫グロブリンの利用を含んで成る。

これらのヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる様々な用途に有用性が見い出せうる。例えば、これらの抗体はHSV抗原の検査、特定のHSV感染化細胞又はウイルスの断片の単離、ワクチンの調製等に利用できる。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応により(E.H.Lobら, Science 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、HindIII部位を含む3'プライマーと、dGテールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI部位を含む5'プライマーを用いてクローニング(図6において手法を示す)。この方法は、可変ドメイン配列にアニールさせるように設計した混

合プライマーを用いるその他の方法(J.W.Larrickら、*Bio/Technology* **7**, 934 (1989)及びY.L.Changら、*BioTech.* **7**, 360 (1989))と比べて、真性可変ドメイン配列を有するクローンをもたらす。このPCR増幅化断片をシーケンシングのためにEcoRI及びHindIIIにより消化し、次いでpUC18ベクターの中にクローンした。Pd79に関しては、2つのガンマー1特異性及び5つのカッパー特異性クローンをシーケンシ化した。この2つのガンマー1特異性クローンは配列において同一であった。この重鎖cDNA断片は19個のアミノ酸のシグナルペプチド、マウス重鎖サブグループBにおけるV領域、Dセグメント、及びゲノムJ。1配列と比較して4箇所の変異を有するJ。1セグメントをコードする。推定のアミノ酸配列を図14Aに示す。

5つのカッパー特異性クローンは2つのグループに属した。2つのクローンは同一であり、そして23番目の保存性アミノ酸システインがチロシンにより置換され、おそらくは非生産性アレルを示すカッパー鎖をコードする。他の3つのクローンは20個のアミノ酸のシグナルペプチド配列、マウスカッパー鎖サブグループBにおけるV領域、及びゲノムJ。2配列と比べて1箇所の変異を有するJ。2セグメントをコードする同一の配列を有する(図14B)。重鎖及びカッパー鎖配列の有効性は以下に述べるキメラ抗体の作製及び発現により確認した。

Fd138-80の重鎖及びカッパー鎖は似たようにクローンした。重鎖及びカッパー鎖の3つのクローンをシーケンシ化した。全ての3つの重鎖クローンは19個のアミノ酸のシグナルペプチド配列、マウス重鎖サブグループIIにおけるV領域、Dセグメント及びJ。3セグメントをコードする同一の配列を有する(図14C)。この3つのカッパークローンは配列においても同一であった。軽鎖フラグメントは20個のアミノ酸のシグナルペプチド、マウスカッパー鎖サブグル

ープVにおけるV領域遺伝子、及びJ。5セグメントをコードする(図14D)。コード配列において両方の鎖は異常を示さなかった；それらの有効性を次にキメラ抗体の作製及び発現により確認した。キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミドpVg1(図15A)はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー(H.Goshartら、*Cell* **41**, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノムC α 1セグメント、並びに選別のためのヒドロマイシン遺伝子(Blochlingerら、*Mol.Cell.Biol.* **4**, 2329 (1984))を含む。プラスミドpVg2(図15B)はpVg1と類似するが、しかしながらヒトゲノムC α 2セグメント及びsp1遺伝子を含む。Pd79及びFd138-80の重及び軽鎖可変領域の断片をポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5'プライマーはATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そしてXbaI部位を含む；3'プライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及びXbaI部位を含む(C.Queenら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**, 10029 (1989)を参照のこと)。改変V領域を関連のプラスミドベクターのCMVプロモーターと定常領域の部分イントロンとの間のXbaI部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/Oマウスミエロマ細胞にトランスフェクトし、そしてsp1発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分泌するクローンをELISAにより検定した。精製したキメラPd79及びFd138-80抗体は、フローサイトメトリーにより、HSV-1感染化vero細胞に結合することが示された。ウイルス中和アッセイは、キメラ抗体がネズミ抗体の中和活性を保持しているこ

とも示した(データは示さず、しかしながら以下のヒト抗体の原稿の結果を参照のこと)。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenらの一般手順に従った(C.Queenら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相同性であるに依り、ネズミCDRをヒトフレームワークに適合させることによる、親和力を低め、CDRへの歪みの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために並び、これによりこの2本の鎖を合成するうえでの非適合性の可能性は低まる。HRRPタンパク質配列データベースに対する配列相同性探索(Micro-Genie Sequence Analysis Software (Beckman)により実施)に基づき、抗体Poaを、Pd79のヒト化のためのフレームワーク配列を担うために選んだ。

Fd79可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラムERCAD (Levitt, *J.Mol.Biol.* **168**, 595 (1983))を利用した。ネズミPd79の精密なモデルの調査は、CDR残基に有意に接触するの十分に近いフレームワーク中の2個のアミノ酸残基を示した(表4)。軽鎖のHRRP位置49におけるLysは、軽鎖のCDR2における3つのアミノ酸(L50のTry、L53のAsn、L55のGln)及び重鎖におけるCDR3の2個のアミノ酸(H99のAsp、H100のTyr)に接している。重鎖の位置93におけるLeuは重鎖のCDR2における2個のアミノ酸(H35のSer、H37のVal)及び重鎖のCDR3におけるアミノ酸(H100CのPhe)との相互作用も示す。それ故、L49のLys及びH93のLeuはヒト化Pd79の作製において維持し、なぜならそれらのヒトPoaフレームワーク残基による置換はCDRに歪みを導入しがちであるからである。更に、Poaフレームワークにおける7個の他の残

基(軽鎖のうちの5個及び重鎖における2個)を共通ヒト残基で置換し(ネズミPd79配列と6通りの選択において同一)、その理由はそれらは、他のヒト抗体においてまれであるからである。フレームワークにおける普通でないアミノ酸の削除は免疫原性を更に低める。このネズミPd79配列及び関連のヒト化配列を図14A、Bに示す。Poaフレームワーク中の置換された残基に下線を付してある。

表 4

超可変領域中の残基と接しているフレームワーク配列中の残基

残基番号 ¹	アミノ酸	接する CDR残基 ²
Pd79		
L49	Lys	L50Y, L53N, L55E, H99D, H100Y
H93	Leu	H35S, H37V, H100CF
Fd138-80		
L36	His	L34V, L89Q
H27	Tyr	H32E, H34I
H30	Tyr	H32E, H53R
H48	Phe	H63F
H66	Lys	H63F
H67	Ala	H63F

1. アミノ酸残基は Kabat系に従って番号付けした(B.A.Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987))；第1文字(H又はL)は重鎖又は軽鎖を意味する。続く番号は残基番号である。最後の文字はアミノ酸の1文字コードである。

2. 超可変領域は Kabatに従って決定した：

軽鎖CDR1：残基24-34；CDR2：50-56；CDR3：89-97

重鎖CDR1: 31-35; CDR2: 50-65; CDR3: 95-102

同様にして、Fd138-80のネズミ重鎖及び軽鎖配列をMBRFタンパク質配列データベースに対する配列相同性探索にかけた。ヒト化Fd138-80のためのフレームワーク配列を組むのにヒト抗体Evの配列を選んだ。Fd138-80のコンピューター作型モデルの調査は、このフレームワーク中の6個のアミノ酸残基がCDR残基との重要な接触のために十分に近くにあることを示した。これらの残基及びその接触対応物を表4に記載する。これらのネズミ残基はヒト化Fd138-80の構造の中で維持された。2個の他の残基(L87のPhe及びH37のMet)はL98 Pheとの有意な接触性を示し、これらはCDR3のすぐ隣りにあり、従ってこれら2個のマウス残基も残した。Hoフレームワーク中の8個のアミノ酸(軽鎖のうちの2個及び重鎖のうちの6個)をネズミ残基で置換し(これらもヒト共通残基を構成する)、なぜならそれらはその他のヒト抗体においてまれであるからである。ネズミFd138-80配列及び対応のヒト化配列を図14Cに示す。Hoフレームワーク中の置換された残基に下線を付した。

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、シグナルペプチドを含むヒト化重鎖及び軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選別した。複数の縮小コドンを変えて、制限部位を作る又は所望されないものを除去した。このヌクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同じスプライスドナーシグナル及び各鎖でのXbaI部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴヌクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴヌクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナルを含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアプライドバイオシステム380B DNA合成機

置で合成した。各オリゴは約110-140の塩基の長さであり、その15塩基は重複していた。二本鎖DNA断片をクレンジングポリマーゼにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。適切な配列を有するこの2種の断片を次にpVal-dbf1又はpVR発現ベクターのXbaI部位にリゲートした。

合成遺伝子をpVal及びpVR発現ベクターの中にクローンさせた。作製した各ヒト化抗体に関して、重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/Oマウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そしてgpt発現について細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーニングし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテインA-セファロースCL-4B(ファルマシア)のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を0.2Mのグリシン-HCl、pH 3.0により増強させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で中和した。この緩衝液をPD10カラム(ファルマシア)に通してPBSに交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化Fd79及びFd138-80抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。両方のヒト化抗体は、RSV-1により感染されたVero細胞に、フルオロサイトメトリー分析においてキメラ抗体と同様に結合し(図16)、これらに対応のウイルス抗原を認識することが示された。この結合活性をより定量的に評価するため、放射性ヨウ素化ネズミ抗体をウイルス感染細胞に結合させ、そしてスクリーン分析を実施した。

ヒト化抗体の親和力をヨウ素化抗体との競合によって決定した。RSV-1により感染された細胞をgB及びgD抗原の起源として利用した。競合抗体(マウス又はヒト化)の量を増やしながら1.5ngの放

射性ヨウ素化トレーサーマウス抗体($2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)に加え、そして0.2mlの結合用緩衝液(PBS+2%のFCS+0.1%のアザイド)の中で 4×10^5 の感染したVero細胞と4で1時間インキュベートした。細胞を洗い、次いでペレット化し、そしてその放射活性を測定した。結合及び遊離のトレーサー抗体の濃度を計算した。結合親和力はBerszofskyの方法に従って計算した(J.A. Berszofsky & I.J. Berwörter, The Fundamental Immunology (W.E. Paul編), Raven Press (New York), 595 (1984))。

この測定値が示すには、ヒト抗体において結合親和力の有意な損失はなかった(表5)。詳しくは、ヒト化Fd79における親和力はネズミFd79と比べて1/2に下った($5.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 対 $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ のK_d)。ヒト化Fd138-80の親和力はネズミ抗体のそれに匹敵した($4.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 対 $5.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ のK_d)。

表 5

ネズミ及びヒト化抗体の結合親和力

	マウス K _d (M ⁻¹)	ヒト化 K _d (M ⁻¹)
Fd79 (抗-gB)	1.1×10^8	5.3×10^7
Fd138-80 (抗-gD)	5.2×10^7	4.8×10^7

ネズミFd79及びFd138-80は補体なしで試験管内でRSV-1を中和することが示されており(J. Kogaら, Virology 151, 385 (1986))。従ってヒト化抗体の中和活性をこれらのマウス抗体と比較した。Vero細胞への接種の前に、同量のネズミとヒト化抗体の希釈系列をウイルスとインキュベートした。4日後、細胞を中性レッドで染めてブラックを識別させた。これらのブラック削減アッセイに由来する結果は、この両方のヒト化Fd79及びFd138-80がそのネズミ対応

物と同等にウイルスを中和せしめることを示唆した(図17A及びB)。ヒト化及びネズミのFd79の両者は 10 nM ($1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)の抗体濃度でブラックの90%を削減させた。同様に、ヒト化及びネズミFd138-80は同じレベルにて90%のブラックを削減を起こさせることができる。これらの抗体は、組織培養物に分散されたウイルスから細胞を守るその能力についても調べられた。Vero細胞にウイルスを0.1pfu/細胞で接種させ、次いで $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体を加える前に37°Cで2時間吸着させた。4日後、感染細胞上のウイルス抗原の検定のために細胞を抗-gB抗体で染めた。結果が示すには、ネズミ及びヒト化Fd79の両者は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で培養細胞を感染から守った(図18A)。しかしながら、ネズミもヒト化Fd138-80も、接種前のそのウイルスを中和する能力にもかかわらず、ウイルスの分散に対して細胞を守ることはできなかった(図18B)。gB及びgDの両者は細胞融合及びウイルス感染に関連すると考えられている(W. Colら, J. Virol. 62, 2596 (1988) 及びA.O. Fuller & P.G. Spear, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5454 (1987))。しかしながら、FdはgBの感染及び細胞融合機能の両方をブロックすることが可能であり、他方Fd138-80はgBの感染機能のみをブロックするため、ウイルスは細胞から細胞へと移ることができ続ける。

結合、中和及び防御結果の全ては、ヒト化Fd79及びFd138-80抗体がネズミモノクローナル抗体の結合活性及び生物学的性質を保持していることを示唆する。とりわけRSVのgB及びgDに対する特異性を有するヒト化抗体の能力は、ウイルス感染の処置におけるヒト化抗体の生体内能力及び免疫原性の研究の機会を提供する。gB及びgDの共通のタイプのエピトープのFd79及びFd138-80による認識(J. Kogaら, Virology 151, 385 (1986))はヘルペス単純ウイルス2型及び1型に対して有効な治療を広げる。

表 6

HSV-2 を鼻口内接種させたマウスの死亡率
に及ぼす HSV 抗体前処置 (-24h) の効果

処 置	数	パーセント	P-値
コントロール	13/15	87	---
偽 薬	13/15	87	NS
ネズミ Fd138			
0.9mg	3/10	30	<0.001
0.3mg	5/10	50	0.01
0.1mg	5/10	50	0.08
ヒト化 Fd138			
0.9mg	1/10	10	<0.001
0.3mg	8/10	80	NS
0.1mg	7/10	70	NS
ネズミ Fd79			
0.9mg	0/10	0	<0.001
0.3mg	2/10	20	<0.01
0.1mg	4/10	40	<0.05
ヒト化 Fd79			
0.9mg	1/10	10	<0.01
0.3mg	3/10	30	0.08
0.1mg	5/10	50	0.08

生体内におけるヘルペス感染症に対するヒト化抗体の薬効を調べ
るため、致死量の HSV-2 の接種の前後にマウスにヒト化抗体を注
射し、そして死亡率をモニターした。動物のグループを 0.9, 0.3 又
は 0.1mg のヒト化 Fd79 又は Fd138-80 のそれぞれにより、ウイルス接
種の 24hr 前又は 24hr 後に腹腔内に処置した。10匹のマウスのグル
ープに致死量の HSV-2 を腹腔内に付与した。マウスを3週間にお
たりモニターした。死亡率を以下の表に示す。

この結果が示すには、マウスの HSV-2 感染に対して有意な防衛
がヒト化 Fd79 及びヒト化 Fd138-80 により獲得された。

表 7

HSV-2 を鼻口内接種させたマウスの死亡率
に及ぼす HSV 抗体後処置 (+24h) の効果

処 置	数	パーセント	P-値
コントロール	12/15	80	---
偽 薬	15/15	100	NS
ネズミ Fd138			
0.9mg	2/10	20	<0.001
0.3mg	4/10	40	0.001
0.1mg	5/10	50	<0.01
ヒト化 Fd138			
0.9mg	3/10	30	<0.001
0.3mg	3/10	30	<0.001
0.1mg	9/10	90	NS
ネズミ Fd79			
0.9mg	6/10	50	<0.01
0.3mg	3/10	30	<0.001
0.1mg	6/10	60	<0.05
ヒト化 Fd79			
0.9mg	3/10	30	<0.001
0.3mg	3/10	30	<0.001
0.1mg	9/10	90	NS

治療における2種以上のヒト化抗体の組合せの利用は抗体耐性株
の発生を低めるために重要である。ヒト化抗体と別の抗ウイルス剤、
例えばアシクロビルとの組合せ治療は、化学治療剤単独では有効で
ないと共に障害に打ち勝つ更なる機会を提供する。Fd79及びFd138-80

はネズミの目のモデルにおけるウイルスの持続性の率を下げるため
(J.F. Hotcalifら, *Cor. Eye Res.* 5, 173 (1987))、ヒト化抗体は典
型的にはその他の抗ウイルス剤と一緒に、再発性生殖器感染症
の状況(その箇所は従来抗ウイルス剤は有効でないとされていた
(L. Coreyら, *N. Eng. J. Med.* 306, 1313 (1982)))を抑えることが
できる。ヒト正常ドメインの一体化はエフェクター機能、例えば抗
体依存性細胞毒性細胞毒性を高めることもでき、これはヒト患者にお
けるより多大な治療的效果をもたらす。

例 II

CD33抗原に対するヒト化免疫グロブリン

米国において年間約10,000~15,000の新しい骨髄性(非リンパ球
性又は顆粒球性とも呼ばれている)白血病のケースがある(*Cancer
Facts & Figures, American Cancer Society, 1987*)。骨髄白血病
には2つの主たる形態: 急性骨髄性白血病(AML)及び慢性骨髄性白
血病(CML)がある。化学治療による処置にもかかわらず、AMLに患
う患者の長期生存率は10~20%以下であり(Clarksonら, *CRC Critical
Review in Oncology/Hematology* 1, 221 (1986))、そして CML
並びに関連の障害、例えば慢性骨髄性単球白血病(CMML)、慢性単
球性白血病(CMNL)及び骨髄形成異常症(MDS)に患う者の生存率は
更に低い。

CD33に結合するその他の抗体はH195である(Tanimotoら, *Leukemia*
3, 339 (1989)及びScheisbergら *Leukemia* 3, 440 (1989))。H195
の広範囲にわたる様々な細胞及び組織との反応性を試験した。正常
な細胞のうちで、H195は一定の単球及び骨髄芽細胞にのみ結合す
ることが報告されている。その探索は、これがその他の造血細胞又は
非造血細胞に結合しないことも報告している。H195は AMLのほと
んどのケース及び骨髄芽球における CMLの全てのケースの細胞に

結合する。

AMLにおけるM195の第1段階臨床試験が実施されている(Scheinbergら、*Proc. ASCO* 9, 207 (1990))。ヨウ素 131により放射ラベル化されたM195は血液及び骨髄の両方における白血病細胞を迅速に、且つ、特異的に標的にすることが見出されている。

本発明により、CD33関連エピトープに特異的に反応するヒト化免疫グロブリンが提供された。少なくとも約 $10^6 M^{-1}$ 、そして好ましくは $10^6 M^{-1} \sim 10^8 M^{-1}$ 又はそれより強いCD33への結合親和力を有するこれらの免疫グロブリンは白血病細胞を破壊することができる。該ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくはCD33抗原に反応性な免疫グロブリンに由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を有するであろう。好ましい態様においては、1又は複数の CDRはM195抗体に由来するであろう。M195は寛骨髄造血幹細胞と結合しなく、従って治療において利用されるM195がそれらの細胞に相互作用してそれらを破壊することが最少限であることが重要であり、これは全ての血液細胞の発生にとって重要である。従って、大量に経済的に製造できる本発明のCD33特異性免疫グロブリンは例えば様々な技術によりヒト患者における骨髄細胞媒介障害の処置において利用される。

ある観点において、本発明はCD33抗原の所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体M195、L483、L182又はHY9に由来する重鎖及び/又は軽鎖をコードする組換え DNAセグメントに関する。このような領域をコードする DNAセグメントは一般に適当なヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。発現に基づいてモノクローナル抗体M195の重及び軽鎖の CDRに由来するポリペプチド鎖をコー

ドする典型的な DNA配列を図19に含ませた。コドン偏置及び重要でないアミノ酸置換に基づき、以下の詳しく述べる通り、その他のDNA配列がこれらの配列に容易に代わることができる。

本発明の抗体は血液学悪性疾患においてそれぞれ典型的に利用されるであろう。例えば、処置に通ずる典型的な障害症状にはAML、CMH、CNHL、CMHOL及びMDSが含まれる(一般に、Hoffbrand & Pettit, *Essential Haematology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1980) を参照のこと)。この抗体は骨髄移植前の骨髄切除のためにも利用される。

本発明の任意のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特に種々の骨髄抗原に反応性のヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適当な抗体には、CD13、CD14、CD15、CD16及びCD34が含まれる(*Leukocyte Typing II*, 前掲、頁 576-732を参照のこと)。

これらの抗体は化学治療剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用される。典型的には、この試薬にはシトシンアラビノシド及びダウノルビシンが含まれるが、しかしながら白血病処置についての業界の当業者によく知られている莫大な数の添加剤(例えば6-チオグアニン)も利用される(Hoffbrand & Pettit, 前掲)。本発明の好ましい薬品製剤は白血病細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用を含んで成る。

本発明のヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる様々な用途に有用性が見出せうる。例えば、これらの抗体はCD33抗原の検査、特定の骨髄細胞の単離等に利用できる。

この実験はM195抗体に固着したが、CD33抗原に対して高い結合親和力を有するヒト化抗体の製造は、L483、L182、HY9又はその他のCD33エピトープに結合するモノクローナル抗体由来の CDRを用いる

ことも考えられる。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応により(E.R. Lohら、*Science* 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、HindIII部位を含む3'プライマーと、dGチールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI部位を含む5'プライマーを用いてクローニングする(図6において手法を示す)。このPCR増幅断片をシーケンシングのためにEcoRI及びHindIIIにより消化し、次いでpUC19ベクターの中にクローニングした。M195に関しては、2つのガンマー2α特異性及び2つのカッパー特異性クローニングをシーケンス化した。この2つのガンマー2αクローニング及び2つのカッパークローニングはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図19に示す。

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミドpVcl-dhfr (図20A)はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー(H. Bocharら、*Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノムCγ1セグメント、並びに選別のためのジヒドロフォレートリダクターゼ(dhfr)遺伝子(Simonsonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))を含む。プラスミドpVK (図20B)はpVcl-dhfrと類似するが、しかしながらヒトゲノムCαセグメント及びspc遺伝子を含む。M195の重及び軽鎖可変領域の誘導体をポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5'プライマーはATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そしてXbaI部位を含み、3'プライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドとハ

イブリダイズしており、そしてスプライドナーシグナル及びXbaI部位を含む(C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989)を参照のこと)。改変V領域を関連のプラスミドベクターのCMVプロモーターと定常領域の部分イントロンとの間のXbaI部位の中にクローニングした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー領域プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/0マウスミエロマ細胞にトランスフェクトし、そしてspc発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分泌するクローンをELISAにより検定した。精製したキメラM195抗体は、フローサイトメトリーにより、CD33抗原を発現するU937細胞に結合することが示された(図21)。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenらの一般手順に従った(C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相溶性であるに従い、ネズミ CDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低めうる、CDRへの型みの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために選び、これによりこの2本の鎖を集成するうえでの非適合性の可能性は低まる。HSPBタンパク質配列データベースに対する配列相溶性探索(Micro Gene Sequence Analysis Software (Bectman)により実施)に基づき、抗体Huを、M195のヒト化のためのフレームワーク配列を選ぶために選んだ。

M195可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラムBRCAD (H. Levitt, *J. Mol. Biol.* 168, 595 (1983))を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接していてそれらと有効な相互作用するM195フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた

(以下のカテゴリ-4)。ヒト化軽及び重鎖H195可変領域を設計するには、次の4つのカテゴリのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置においてEu抗体と同一のアミノ酸を選択した:

- (1) その位置が CDR に属した。
- (2) その位置では、Eu アミノ酸がヒト抗体にみれており、一方、その位置では、H195 アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。
- (3) その位置が CDR のすぐ近くであった。
- (4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域(CDR)に物理的に近いことを示唆した。

カテゴリ(2)において、「まれ」とは、Euの軽及び重鎖と同一のサブグループにおいてヒト配列の約20%以下で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈され(Kabatら、前掲に定義)、そして「典型的」とは、そのサブグループにおいてヒト配列の約25%以上、しかしながら一般には50%以上で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈される。これらのカテゴリにおける位置に関して、マウスH195抗体に由来するアミノ酸を用いた:各カテゴリにおけるアミノ酸を表8に示す。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリに属する。ヒト化H195の軽及び重鎖可変ドメインの最終配列を図22に示し、Eu配列と比較する。

表 8

カテゴリ	軽 鎖	重 鎖
1	24-38, 54-60, 93-101	31-35, 50-66, 99-105
2	10, 52, 67, 110	93, 95, 98, 106, 107, 108, 110
3	--	30, 67, 98, 106
4	40, 52, 74	27, 30, 48, 68, 98

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列にお

いて見い出せるコドンを利用して、マウスのH195鎖中と同一のシグナルペプチド(図19)を含むヒト化重及び軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選別した。複数の縮重コドンを変えて、制限部位を作る又は所望されないものを除去した。このヌクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同ジブライズドナッシングナル及び各端での Xba I 部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴヌクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴヌクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライズドナッシングナル(図23)を含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアプライドバイオシステム380B DNA合成装置で合成した。各オリゴは約110-140の塩基の長さであり、その約15塩基は重複していた。各対のオリゴヌクレオチドから二本鎖 DNA断片をクレンジングにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次にpVg1-dbf1又は pVg1発現ベクターの Xba I 部位に、完全な重及び軽鎖遺伝子を選択せしめる正しい方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った(Hanahanら、前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/Oマウスミエロマ細胞にトランスフェクトし、そして sp2発現について細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーニングし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテインA-セファロースCL-4B(ファルマシア)のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を0.2Mのグリシン-HCl、pH 3.0により溶解させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で

中和した。この緩衝液をPD10カラム(ファルマシア)に通して PBS に交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化H195抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。該ヒト化抗体は、U937細胞に、フルオロサイトメリー分析においてキメラ抗体と同様に結合し(図21)、これが同じCD33抗原を認識することが示唆された。

ヒト化抗体の親和力は放射性ヨウ素化マウスH195抗体との競合によって決定した(図24)。結合親和力は Berszofskyの方法に従って計算した(J.A.Berszofsky and I.J.Berkowerの、*Fundamental Immunology* (W.E.Paul編)、Raven Press (New York), 595 (1984))。マウスH195は公開の値(Tanimotoら、前掲)に匹敵する親和力を有し、そしてヒト化H195抗体は実験誤差の範囲内でマウスH195と同程度の親和力を有していた。

ヒト化H195は、ヒトエフェクター細胞及びヒトCD33-発現性細胞を用いると、抗体依存性細胞毒性を媒介するのに有用である。これは例えばJungkhaら、*Cancer Research* 50, 1495 (1990)により報告されているその他のヒト化抗体と類似している。

残念ながら、非ヒトモノクローナル抗体、例えばH195の利用はヒトの処置、特に繰り返し治療法において一定の欠点を有する。

例 IV

CHV抗原に対するヒト化免疫グロブリン

サイトメガロウイルスは免疫抑制状態の個体、特に骨髄移植受容者、器官移植受容者及びAIDS患者の主たる病因となる(一般に、Fieldら編、*Virology* 第2版、Raven Press, New York 頁1981-2010 (1990)を参照のこと)。骨髄移植患者の約15%はCHV肺炎を発生し、85%の死亡率にある(Heyers, *Rev. Inf. Dis.* 11 (付7),

S1691 (1989))。AIDS患者の約10%は重症なCHV障害:及び特異的な後天性CHVを、高い罹病率及び死亡率を伴って発症し、新生児の1%に影響が及ぼされている(Fields前掲)。

薬剤ガンシクロビルはCHV感染症の一定の状態、特に肺臓肺炎及び腎臓炎に対して有効であるが、しかしながらCHV肺炎に対してはあまり有効でなく、そしてかなりの毒性を有している。プールしたヒト免疫グロブリン調製物の利用は骨髄移植患者におけるCHVの予防に関していくつかの利益効果が示されており(Heyer前掲)、そして高用量の免疫グロブリンとガンシクロビルの組合せはCHV肺炎に対して有効であることが報告されている(Saundersら、*Trans. Proc. XII* (付7) 132 (1987))。しかしながら、市販の免疫グロブリンの限界的な有効性、様々な種族能力及び高い価値は重大な問題を醸している。従って、CHVに対して有効な新規の薬剤の強い要望がある。

CHVはウイルスのヘルペスウイルス科の構成員であり、従って大きな二本鎖DNAコア、タンパク質カプシド、及び表面にウイルス糖タンパク質を有する外部脂質エンベロープを有している。少なくとも8種類のタンパク質がCHVのエンベロープ上で検出されており(Brillら、*J. Virol.* 52, 3309 (1988))、そしてCHVのDNA配列に基づいて他も存在していることが確定されている(Chenら、*Nature* 344, 744 (1990))。2種類の特に有意義なCHV糖タンパク質、即ち、gB (p130/55又はgp55-116とも呼ばれる)及びgH (p86とも呼ばれている)に対するネズミモノクローナル抗体が製造されており

(Rasmussenら、*Virology* 183, 308 (1988)及びBrillら、前掲)、そしてウイルスの感染性を中和することが示されている。gHに対する3種類のその他の中和抗体がCHV5、CHV109及びCHV115と命名されている。CHVに対するヒトモノクローナル抗体も製造されている

(Ehrlichら, *Hybridoma* 6, 151 (1987))。

動物モデルにおいて、ネズミモノクローナル抗体がヘルペスウイルス科の構成員を含む様々なウイルスにより生ずる感染症の処置において有効であることが示されている(例えばMetcalfeら, *Intervirology* 29, 39 (1988) を参照のこと)。従って、かかる抗体はCMV感染症の処置において有用でありうる。残念ながら、非ヒトモノクローナル抗体、例えばCMV及びCMV115は以下に説明する通り、ヒトの処置、特に繰り返し治療法において一定の欠点を有している。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、しかも治療型剤及びその他の用途にとって適切な状態において簡単に、且つ、経済的に製造されるCMV抗原に対して特異的なヒト化免疫グロブリンの改良形態が要望されている。本発明はこれら及びその他の要望を満足せしめる。

本発明に従い、CMV及びCMV感染細胞に特異的に反応性なヒト化免疫グロブリンを提供する。少なくとも約 $10^4 M^{-1}$ 、そして好ましくは $10^5 M^{-1}$ ~ $10^6 M^{-1}$ 又はそれより強力なCMV特異的抗原に対する結合親和力を有するこれらの免疫グロブリンは例えば細胞のCMV感染をブロックすることができる。該ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくはCMV抗原に反応性な免疫グロブリンに由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を有するであろう。好ましい態様において、1又は複数のCDRはCMV5、又はCMV109、又はCMV115抗体に由来するであろう。大量に経済的に製造されうる本発明の免疫グロブリンは例えば種々の技術によるヒト患者におけるCMV媒介障害の処置において有用である。

ある観点において、本発明はCMV抗原の所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体CMV5

クロビルが含まれるが、しかしながらCMV処置についての当業者によく知られている莫大な数の他の試薬も含まれる。本発明の好ましい実製品はCMV感染細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用を含んで成る。

本発明のCMV特異的ヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる様々な用途に有用性が見い出せる。例えば、これらの抗体はCMV抗原の検査、特定のCMV感染細胞の単離等に利用できる。

特に、本明細書でヒト化CMV5を製造したのと同じ方法を、ヒト化CMV109、CMV115又はその他の抗CMV抗体を製造するために利用できうる。

実 験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応により(E.Y.Lohら, *Science* 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、Hind III部位を含む3'プライマーと、dGチールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI部位を含む5'プライマーを用いてクローンする(図6において手法を示す)。このPCR増幅断片をシーケンシングのためにEcoRI及びHind IIIにより消化し、次いでpUC18ベクターの中にクローンした。CMV5に関しては、2つのガンマー2α特異性及び2つのカバー特異性クローンをシーケンシした。この2つのガンマー2αクローン及び2つのカバークローンはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図25A及び25Bに示す。同様に、当業界によく知られている技術を利用して、CMV109及びCMV115抗体に関するcDNAを獲得してその配列を決定することができる。

又はCMV115に由来する重鎖及び/又は軽鎖のCDRをコードする組換えDNAセグメントに挿入する。このような領域をコードするDNAセグメントは一般に適当なヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。モノクローナル抗体CMV5の重鎖及び軽鎖のCDRを含んで成るポリペプチド鎖を発現に基づいてコードする典型的なDNA配列を図25に含ませている。コドン論量及び重要でないアミノ酸置換に基づき、以下に述べる通り、その他のDNA配列がこれらの配列に容易にとって代わるることができる。

断片が1又は複数の免疫グロブリン活性(例えば補体固定活性)を有する、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができる。これらのポリペプチド断片は、当業界によく知られている方法による完全抗体のタンパク質分解によって、又は部位特異的突然変異誘発を利用し、ベクターpVK及びpVg1-dhfr(図26)における所望の位置に停止コドンを導入する(例えばCH1の後ろに挿入してFab断片を作る、又はヒンジ領域の後ろに挿入して(Fab')₂断片を作る)ことによって製造されうる。一本鎖抗体はVLとVHをDNAリンカーで連結することによって製造されうる(Hustonら、前掲、及びBirdら前掲を参照のこと)。

本発明の抗体は典型的にはCMV関連障害の処置において各別に用途が見い出せる。例えば、処置に適する典型的な疾患症状にはCMV肺炎、新生児CMV感染症、CMV単核細胞症、並びにCMV関連結核膜炎及び腎臓炎が含まれる。本発明の任意のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特に様々なCMV抗原に反応性なヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適切な抗原にはgB及びgEタンパク質が含まれる。この抗体は化学治療剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用されうる。典型的には、この試薬にはアシクロビル又はガンシ

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミドpVg1-dhfr(図26A)はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー(H.Boshartら, *Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノムCγ1セグメント、並びに選択のためのジヒドロフオレートリダクターゼ(dhfr)遺伝子(Simonsonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))を含む。プラスミドpVK(図26B)はpVg1-dhfrと類似するが、しかしながらヒトゲノムCαセグメント及びsp1遺伝子を含む。CMV5の重鎖及び軽鎖可変領域の誘導体をポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5'プライマーはATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そしてXba I部位を含み、3'プライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドにハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及びXba I部位を含む(C. Queenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989) を参照のこと)。改変V領域を関連のプラスミドベクターのCMVプロモーターと定常領域の部分イントロンとの間のXba I部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカバー版プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/Oマウスミエロマ細胞にトランスフェクトし、そしてsp1発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分泌するクローンをELISAにより検定した。精製したキメラCMV5抗体は、CMV感染ヒト胎芽組織培養細胞の染色により、gE抗原を発現するCMV感染細胞に結合することが示された。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenら

(1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相同性であるに従い、ネズミ CDR をヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低めうる。CDR への組み込みの傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために並び、これによりこの2本の鎖を重組するうえでの非適合性の可能性は低まる。ABRPタンパク質配列データベースに対する配列相同性の探索 (Micro Gene Sequence Analysis Software (Beckman) により実施) に基づき、抗体 H01 を、CHV5 のヒト化のためのフレームワーク配列を組むために選んだ。

CHV5 可変領域のモデルを作製するためにコンピュータプログラム ENCAD (M. Levitt, *J. Mol. Biol.* 168, 595 (1983)) を用いた。このモデルは、CDR に十分に密着してそれらと有効に相互作用する CHV5 フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた (以下のカテゴリ 4)。ヒト化軽鎖及び重鎖 CHV5 可変領域を設計するには、次の4つのカテゴリのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置において H01 抗体と同一のアミノ酸を選択した:

- (1) その位置が CDR に属した、
 - (2) その位置では、H01 アミノ酸がヒト抗体にまれであり、一方、その位置では、CHV5 アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。
 - (3) その位置が CDR のすぐ近くであった。
 - (4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域 (CDR) に物理的に近いことを示唆した。
- カテゴリ (2) において、「まれ」とは、H01 の軽鎖及び重鎖と同一のサブグループにおいてヒト配列の約20%以下で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈され (Kabata & 前掲に定義)、そして「典型的」とは、そのサブグループにおいてヒト配列の約25%以上、しかしながら一般には50%以上で見い出せるアミノ酸を含むものと解

スドナーシグナル (図28) を含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアプライドバイオシステム 380B DNA 合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 の塩基の長さであり、その約15塩基は重複していた。各対のオリゴヌクレオチドから二本鎖 DNA 断片をクレンジウポリメラーゼにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18 ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次に pVg1-dhfr 又は pVE 発現ベクターの Xba I 部位に完全な重鎖及び軽鎖遺伝子を生成するのに適切な方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った (Hanlon & 前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって 5×10^8 /0 マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そして ϕ 発現のために細胞を選別した。ELISA によって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーンし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテイン A-セファロース CL-4B (ファルマシア) のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を 0.2 M のグリシン-HCl、pH 3.0 により解離させ、次いで 1 M のトリス、pH 8.0 で中和した。この緩衝液を PD10 カラム (ファルマシア) に通して PBS に交換した。

一過性トランスフェクションによってもヒト化抗体を製造した。重鎖及び軽鎖プラスミドを DEAE-デキストラン法 (Gusella & Mol. Cell. Biol. 4, 1043 (1984)) により S194 細胞にトランスフェクトし、そして前記の通りに培養からヒト化 CHV5 抗体を精製した。抗体をヒト IgG に関する ELISA アッセイによって定量化した。ヒト化抗体の性質

ヒト化 CHV5 抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。

取される。これらのカテゴリにおける位置に関して、マウス CHV5 抗体に由来するアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、その位置は第5カテゴリに属する。即ち、その位置では H01 アミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そして CHV5 アミノ酸が頻なり、しかもまれであるとき。この場合、この位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリにおけるアミノ酸を表 1 に示している。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリに属しうる。ヒト化 CHV5 の軽鎖及び重鎖可変ドメインの最終配列を図 27A-B に示し、H01 配列と比較する。

表 9

カテゴリ	軽 鎖	重 鎖
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-108 69, 80
2		69, 80
3	49	30
4		24, 27, 28, 30, 97
5		5

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、マウスの CHV5 鎖中と同一のシグナルペプチド (図28) を含むヒト化重鎖及び軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選別した。複数の編成コドンを変えて、制限部位を作る又は所望されないものを除去した。このヌクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同じサブライスドナーシグナル及び各端での Xba I 部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴヌクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴヌクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライ

スドナーシグナル (図28) を含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアプライドバイオシステム 380B DNA 合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 の塩基の長さであり、その約15塩基は重複していた。各対のオリゴヌクレオチドから二本鎖 DNA 断片をクレンジウポリメラーゼにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18 ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次に pVg1-dhfr 又は pVE 発現ベクターの Xba I 部位に完全な重鎖及び軽鎖遺伝子を生成するのに適切な方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った (Hanlon & 前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって 5×10^8 /0 マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そして ϕ 発現のために細胞を選別した。ELISA によって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーンし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテイン A-セファロース CL-4B (ファルマシア) のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を 0.2 M のグリシン-HCl、pH 3.0 により解離させ、次いで 1 M のトリス、pH 8.0 で中和した。この緩衝液を PD10 カラム (ファルマシア) に通して PBS に交換した。

一過性トランスフェクションによってもヒト化抗体を製造した。重鎖及び軽鎖プラスミドを DEAE-デキストラン法 (Gusella & Mol. Cell. Biol. 4, 1043 (1984)) により S194 細胞にトランスフェクトし、そして前記の通りに培養からヒト化 CHV5 抗体を精製した。抗体をヒト IgG に関する ELISA アッセイによって定量化した。ヒト化抗体の性質

ヒト化 CHV5 抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。

取される。これらのカテゴリにおける位置に関して、マウス CHV5 抗体に由来するアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、その位置は第5カテゴリに属する。即ち、その位置では H01 アミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そして CHV5 アミノ酸が頻なり、しかもまれであるとき。この場合、この位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリにおけるアミノ酸を表 1 に示している。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリに属しうる。ヒト化 CHV5 の軽鎖及び重鎖可変ドメインの最終配列を図 27A-B に示し、H01 配列と比較する。

マウス及びヒト化 CHV5 の親和力を別の方法において比較するため、結合実験を行った。前記の CHV5 感染性 HBL 細胞のプレートをプロットと 37°C で 30 分間インキュベートした。このプロットを洗出し、そして 75 μ l の PBS 中のマウス又はヒト化 CHV5 の懸濁液を各ウェルに加えた。次に PBS 中の 125 μ l の放射性ヨウ素化マウス CHV5 (1 μ Ci/ μ g) (28,000 cpm を含む) を各ウェルに加えた。次いで 37°C で 2.5 時間インキュベートした。このプレートを PBS で 5 回洗い、そ

して各ウェルの内容物を2%のSDS 200 μ lで可溶化し、そしてカウントした。上昇する濃度のマウス及びヒト化CHV5はほぼ同程度に放射性ラベル化CHV5の結合を阻害し(図29)、従ってヒト化CHV5はマウスCHV5とほぼ同じ結合親和力を有する。異常な抗体はこのアッセイにおいて結合しなかった。

CHVを中和するヒト化CHV5の能力をマウスCHV5のそれと比べた。マウス及びヒト化CHV5を96穴プレートのウェルの中で、100 μ lのDMEM培地+2%のFCSの中に2倍に順々に希釈した。100の50%-組織培養物感染用量(TCID₅₀)単位を含むように希釈したCHV 100 μ lを各ウェルに加え、そして37℃で60分間インキュベートした。抗体-ウイルス混合物の各ウェルを96穴プレート中の半量密BRL細胞のウェルに加え、これより培地を除去した。細胞を5日間インキュベートし、そして顕微鏡で各ウェル中の細胞障害効果(CPE)を観べた。90%でCPEを阻害する最も高い希釈率の抗体が、抗体の中和能力の測定のための尺度である。このヒト化CHV5抗体はマウスCHV5抗体とほぼ同程度にCHV抗体を中和した。

例 V

哺乳動物において、免疫応答は外来物質、即ち抗原に特異的に相互作用するいくつかの細胞のタイプにより媒介される。このような細胞タイプのうちの1つであるB細胞は、抗体の生産のもとである。その他の細胞のタイプ、T細胞は、ウイルスにより感染された細胞を破壊する、又はB細胞及びその他の造血細胞(T細胞を含む)の両者の生体内動態をコントロールする広範囲にわたる様々な細胞のサブセットを含む。第3の細胞タイプ、マクロファージは、主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質に関連する抗原を処理及びT細胞に提供する。これらの細胞タイプ間の連絡はリンホカイン、例えばインターロイキン1~6及び γ -IFNにより複雑な方法で媒介される。

る。従って、抗- γ -IFN抗体はこれら及びその他の自己免疫疾患の処置において有効でありうる。

ヒト患者の処置のため、ヒト γ -IFNに結合してそれを中和するネズミモノクローナルが利用されうる(例えばYasumotoら、*Microbiol. Immunol.* 22, 339 (1988)を参照のこと)。AF2と命名され、ヒト γ -IFNを中和し、そして γ -IFNの細胞レセプターへのその結合を阻害する別のネズミモノクローナル抗体を本明細書に開示している。残念ながら、非ヒトモノクローナル抗体は、例えばAF2の利用はヒトの処置、特に繰り返し治療法において一定の欠点を有している。

本発明に従い、 γ -IFN エピトープに特異的に反応性なヒト化免疫グロブリンを提供する。少なくとも約 10^6 M⁻¹、そして好ましくは 10^6 M⁻¹~ 10^{11} M⁻¹又はそれより強力な、 γ -IFN に対する結合親和力を有するこれらの免疫グロブリンは例えばヒト γ -IFNを中和することができる。該ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくは γ -IFNに反応性な免疫グロブリンに由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を有するであろう。好ましい態様において、1又は複数のCDRはAF2抗体に由来するであろう。大量に経済的に製造されうる本発明の免疫グロブリンは例えば種々の技術によるヒト患者における自己免疫障害の処置において有用である。

ある観点において、本発明は γ -IFNの所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体AF2に由来する重鎖及び/又は軽鎖のCDRをコードする組換えDNAセグメントに関連する。このような領域をコードするDNAセグメントは一般に適当なヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。モノクローナル抗体AF2の重鎖及び軽鎖

(一般に、Paul, W.E.編、*Fundamental Immunology*, 第2版、Raven Press, New York (1988)を参照のこと)。

一つの重要なリンホカインは γ -IFNであり、これは一定のT細胞により分泌される。その抗ウイルス活性に加えて、 γ -IFNはナチュラルキラー(NK)細胞を刺激し、マクロファージを活性化し、そして細胞の表面上のMHC分子の発現を刺激する(Paul前掲、頁622-624)。従って、 γ -IFNは一般に免疫細胞の数多くの機能を増強するのに働き、そしてかかる増強が所望される、例えば癌の処置のような場合において、治療法の理知的な候補となる。他方、免疫系が過剰活性である疾患症状、例えば自己免疫疾患及び移植物拒絶において、 γ -IFNの拮抗剤が γ -IFNの刺激作用を中和することによりこの疾患を処置するために用いられうる。

1つの種類の γ -IFNの有効な拮抗剤は、それに結合し、そして中和するモノクローナル抗体である(例えばVan der Heideら、*J. Gen. Virol.* 67, 1059 (1986)を参照のこと)。移植の試験管内及び生体内マウスモデルにおいて、抗- γ -IFN抗体が拒絶を遅らせる又は防ぐことが示されている(Landolfoら、*Science* 229, 176 (1986)及びRosenbergら、*J. Immunol.* 144, 4648 (1990))。 γ -IFNに対するモノクローナル抗体による、全身系エリテマトーデス(SLE)様症状の発症に対するマウスブローンの処置は、この疾患の発症を有意に遅らせた(Jacobら、*J. Exp. Med.* 168, 798 (1987))。一定の条件のもとで、抗- γ -IFN抗体はラットにおけるアジュバント関節炎を緩和し(Jacobら、*J. Immunol.* 142, 1500 (1989))。この抗- γ -IFNがヒト患者における一定のケースのリウマチ性関節炎に有効でありうることを示唆している。患者における多発性硬化症(MS)は γ -IFNによる処置により悪化し(Pasitichら、*Neurology* 36 (付1), 285 (1986))、従って抗- γ -IFN抗体はMSを緩和しう

のCDRを含んで成るポリペプチド鎖を発現に基づいてコードする典型的なDNA配列を図30に含ませている。コドン簡量及び重要でないアミノ酸置換に基づき、以下に述べる通り、その他のDNA配列がこれらの配列に容易にとり代わることができる。

他方、断片が1又は複数の免疫グロブリン活性(例えば補体固定活性)を有する、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができる。これらのポリペプチド断片は、当業界によく知られている方法による完全抗体のタンパク質分解によって、又は部位特異的突然変異誘発を利用し、ベクター-pVIII及びpVg1-dhfr(図31)における所望の位置に停止コドンを導入する(例えばCB1の後ろに導入してFab断片を作る、又はヒンジ領域の後ろに導入して(Fab')断片を作る)ことによって製造されうる。一本鎖抗体はVLとVHをDNAリンカーで連結することによって製造されうる(Hustonら、前掲、及びBirdら前掲を参照のこと)。

本発明の抗体は典型的には自己免疫症状の処置において各別に用途が具い出せるであろう。例えば、処置に適する典型的な疾患症状は移植対宿主疾患及び移植物、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓、他の移植を受けた患者における移植拒絶が含まれる。その他の疾患には自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、全身系エリテマトーデス及び重症筋無力症が含まれる。

本発明のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特にその他のリンホカイン又はリンホカインレセプターに反応性なヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適当な抗原にはインターロイキン1~10、並びにIL-2レセプターのp55及びp75鎖が含まれる(Waldmann, *Annu. Rev. Biochem.* 58, 875 (1989)及びGusellaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989)を参照のこと)。その他の抗原には、疾患の

もとなる細胞上のそれ、例えば、いわゆる「認識分類」(Clusters of Differentiation) 抗原が含まれる(Leucocyte Typing II, A.J. McMichael編、Oxford University Press (1987))。

これらの抗体は化学治療剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用される。典型的には、この試薬には非ステロイド系抗炎症剤(例えばアスピリン、イブプロフェン)、ステロイド(例えばプレドニソン)及び免疫抑制剤(例えばシクロスポリンA、シトキサン)が含まれるが、しかしながら当業者によく知られる莫大な数の異なる試薬の利用も含んで成る。本発明の好ましい薬品製剤は γ -IPN 分泌細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用も含んで成る。

本発明のヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる様々な用途に有用性が見い出せる。例えば、これらの抗体は γ -IPN 抗原の検査等に利用される。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応により(B.Y. Lohら、*Science* 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、Hind III 部位を含む3' プライマーと、dGテールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI 部位を含む5' プライマーを用いてクローニング(図6において手法を示す)。このPCR増幅化断片をシーケンシングのためにEcoRI及びHind III により消化し、次いでpUC18ベクターの中にクローニングした。AP2に関しては、2つのガンマー2 α 特異性及び2つのカッパー特異性クローニングをシーケンシングした。この2つのガンマー2 α クローニング及び2つのカッパークローニングはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図30に示す。

ネズミ CDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低める、CDRへの組み込みの傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために並び、これによりこの2本の鎖を無作為なうでの非適合性の可能性は低まる。MBRFタンパク質配列データベースに対する配列相同性(Micro Gene Sequence Analysis Software (Beckman)により実施)に基づき、抗体Eaを、AP2のヒト化のためのフレームワーク配列を組むために選んだ。

AP2可変領域のモデルを作成するためにコンピュータプログラム ENCAD (N. Levitt, *J. Mol. Biol.* 168, 595 (1983))を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接してそれらと有効に相互作用するAP2フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた(以下のカテゴリー4)。ヒト化軽鎖及び重鎖AP2可変領域を設計するには、次の4つのカテゴリーのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置においてEa抗体と同一のアミノ酸を選択した：

- (1) その位置が CDRに属した。
- (2) その位置では、Eaアミノ酸がヒト抗体にまれであり、一方、その位置では、AP2アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。
- (3) その位置が CDRのすぐ近くであった。
- (4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域(CDR)に物理的に近いことを示唆した。

カテゴリー(2)において、「まれ」とは、Eaの軽鎖及び重鎖と同一のサブグループにおいてヒト配列の約20%以下で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈され(Kabatら、前掲に定義)、そして「典型的」とは、そのサブグループにおいてヒト配列の約25%以上、しかしながら一般には50%以上で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈される。これらのカテゴリーにおける位置に関して、マウスAP2抗

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミドpVg1-dhfr (図31A)はヒトサイトメガロウイルス181プロモーター及びエンハンサー(H. Bosbartら、*Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノムC γ 1セグメント、並びに選別のためのジヒドロフォレートリダクターゼ(dhfr)遺伝子(Simonsenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))を含む。プラスミドpVg (図31B)はpVg1-dhfrと類似するが、しかしながらヒトゲノムC α セグメント及びspt遺伝子を含む。AP2の重鎖及び軽鎖可変領域の誘導体をポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5' プライマーはATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そしてXba I 部位を含み、3' プライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及びXba I 部位を含む(C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989))を参照のこと)。改変V領域を関連のプラスミドベクターのCMVプロモーターと定常領域の部分イントロンとの間のXba I 部位の中にクローニングした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって3p2/0マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そしてspt発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分泌するクローンをELISAにより検定した。キメラAP2抗体は、ELISAにより、 γ -IPN に結合することが示された。ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenらの一般手順に従った(C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相同性であるに依り、

体由来するアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、その位置は第5カテゴリーに属する。即ち、その位置ではEaアミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そしてAP2アミノ酸が異なる、しかもまれであるとき。この場合、この位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリーにおけるアミノ酸を表10に示している。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリーに属しうる。ヒト化AP2の軽鎖及び重鎖可変ドメインの最終配列を図32に示し、Ea配列と比較する。

表 10

カテゴリー	軽 鎖	重 鎖
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-106
2	48	93, 95, 98, 107, 108, 109, 111
3		30, 98, 107
4	48, 70	27, 28, 30, 98, 107
5	63	

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、典型的な免疫グロブリンシグナル配列と共に重鎖及び軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選別した。複数の縮重コドンを避けて、制限部位を作る又は所望されないものを除去した。このヌクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同ヒスプライスドナーシグナル及び各鎖でのXba I 部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重鎖合成オリゴヌクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互重鎖上の2対の重鎖オリゴヌクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナル(図33)を含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアプライドバイオン

システム380B DNA合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 の塩基の長さであり、その約15塩基は重複していた。各封のオリゴヌクレオチドから二本鎖 DNA断片をクレノウポリメラーゼにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次にpVcl-dbf又は pVH発現ベクターの *Eco*I 部位に完全な重及び軽鎖遺伝子を産生するのに適切な方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った (Haplotisら、前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/0マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そして *gpi* 発現のために細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体産生をアッセイすることによりクローンをスクリーンし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテインA-セファロースCL-4B (ファルマシア) のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を 0.2M のグリシン-HCl、pH 3.0により溶解させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で中和した。この緩衝液をPD10カラム (ファルマシア) に通して PBS に交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化AF2抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。このヒト化抗体は ELISAアッセイにおいて、マウス及びキメラ抗体と類似の状態で γ -IFN に結合し、これが γ -IFN を認識することが示された。

マウスAF2抗体とヒト化AF2抗体の結合親和力を比較するため、競合 ELISAアッセイを行った。ELISAプレートに、各ウェルの中に PBS中の γ -IFN の 500ng/mlの溶液 100 μ l を加え、そして4℃で一晩インキュベートすることによってヒト組織換え γ -IFN でコー

トした。その後の工程は室温で行った。 γ -IFN 溶液を除去し、そして各ウェルに 200 μ l の ELISA緩衝液 200 μ l (PBS中の 0.1%の Tween20、1%の牛血清アルブミン) を加え、そして1hrインキュベートした。溶液を除去した後、PBS中の様々な量の結合抗体 (マウスAF2又はヒト化AF2) 100 μ l を各ウェルに、優れたELISA応答を示すように予め決定しておいた一定量のヒト化AF2と共に加えた。このプレートを1時間インキュベートし、次いでELISA緩衝液で3回洗った。100 μ l の PBS中の、過剰となるように予め決定しておいた一定量の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) -コンジュゲート化ストレプトアビジンを各ウェルに加え、そして30分インキュベートした。このプレートを ELISA緩衝液で3回洗ひ、そして HRPのための基質溶液 100 μ l を各ウェルに加えた。このプレートを10-30分インキュベートし、そして各ウェルの光学密度をELISAリーダー (BioRad) により決定した。結合抗体マウスAF2及びヒト化AF2の上昇する濃度に伴う光学密度の減少をプロットした。マウスAF2及びヒト化AF2は同様に結合し合い、それらの γ -IFN に対する結合親和力がほぼ同じであることが示された。この手順は当業界によく知られている (例えば、HarlowとLane、前掲)。

γ -IFNの重要な生物活性は細胞上のクラス II HLA抗原の発現の誘発にある。この特性を中和するマウス及びヒト化AF2の能力を決定するため、1.0x10⁶のDMEM培養+10%の FCS中の約 5x10⁴ のES2941細胞 (Sasabeら、J. Immunol. 130, 1492 (1983))を24穴プレートの各ウェルの中に分注した。一夜のインキュベーション後、0.1nMのインターフェロン及び様々な量のマウス又はヒト化AF2をこの細胞に加え、そしてこのプレートを72時間インキュベートした。この細胞を0.05MのEDTAでこのプレートから取り出し、HLA-D抗原に対するアメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC) 由来の

モノクローナル抗体L243で染め、洗ひ、FITCコンジュゲート化ヤキ抗マウスIgで染め、そしてFACSscan (Becton-Dickinson) で分析した。上昇する濃度のマウスAF2は細胞の蛍光を低め (図34)、この抗体が γ -IFN による HLA-Dの誘発を防げることが示された。このヒト化AF2はこのアッセイにおいてマウスAF2と同じように働き、これが γ -IFN の生物活性を中和することが示された。

以上より、本発明のヒト化免疫グロブリンは他の γ -IFN 特異的抗体に勝る倍大なる利点を擁することが期待されるであろう。マウスモノクローナル抗体と比べ、本ヒト化免疫グロブリンはより経済的に製造でき、そして外来の7ミノ酸配列を実質的に少なく含む。ヒト患者に注射された後のこの抗原性の低められた傾向は有意なる治療的改善を示す。

本明細書に挙げた全ての文献及び特許明細書は本明細書の中に参考として組み入れられる。本発明を例示及び理解を促すための実施例によってある程度詳しく説明してきたが、一定の変更及び改良は添付の請求の範囲に属するであろう。

```

1   D I V L T Q S P A S L A V S L G O R A T
1   E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T
21  I S C R A S O S V S T S T Y N Y M H W Y
21  L S C R A S O S V S T S T Y N Y M H W Y
41  Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S N L E S
41  Q Q K P G Q S P R L L I K Y A S N L E S
61  G V P A R F S G S G F G T D F T L N I H
61  G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S
81  P V E E E D T V T Y Y C O H S W E I P Y
81  P L E S E D F A V Y Y C O H S W E I P Y
101 T F G G G T K L E I K
101 T F G Q G T R V E I K

```

FIG. 1A

```

1   Z M I L V E S G G G L V K P C A S L E L
1   E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
21  S C A A S G F T F S N Y G L S W V R O T
21  S C A A S G F T F S N Y G L S W V R O A
41  S D R R L E M V A S I S R G G G R I Y S
41  P G K G L E M V A S I S R G G G R I Y S
61  P D N L K G R F T I S R E D A K N T L Y
61  P D N L K G R F T I S R N D S K N T L Y
81  L Q M S S L K S E O T A L Y Y C L R E G
81  L Q M N S L Q A E O T A L Y Y C L R E G
101 I Y Y A D Y G F F D V W G T G T T V : V
101 I Y Y A D Y G F F D V W G Q G T L V T V
121 S S
121 S S

```

FIG. 1B

```

1  D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S
1  D I O M T Q S P S T L S A S V G D R V T
21  I T C K A S O D V G S A V V W H Q Q K S
21  I T C K A S O D V G S A V V W H Q Q K P
41  G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D
41  G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P S
61  R F T G S G S G T D F T L T I T W V Q S
61  R F T G S G S G T E F T L T I S S L Q P
81  E D L A D Y F C O Q Y S I F P L T F C A
81  D D F A T Y F C O Q Y S I F P L T F C O
101  G T R L E L K
101  G T K V E V K

```

FIG. 2A

```

1  D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
1  D I O M T Q S P S L S A S V G D R V T
21  I S C A S E S S V D N Y G I S P M N W F
21  I T C A A S E S S V D N Y G I S P M N W F
41  Q Q K P C Q P F K L L I Y A A S H O G S
41  Q Q K P C A P F K L L I Y A A S H O G S
61  G V P A R F S G S G S G T D F S L N I H
61  G V P S R F S G S G S G T D F T L N I S
81  P M E Z D D T A M Y F C Q Q S K E V P W
81  S L Q P D D F A T Y Y C Q Q S K E V P W
101  T F G G G T K L E I K
101  T F C O G T K V E I K

```

FIG. 3A

```

1  Q V O L Q Q S D A E L V K P G A S V K I
1  Q V O L V Q S G A E V K K P G S S V K V
21  S C K V S G Y T F T D H T I H W M K Q R
21  S C K A S G Y T F T D H T I H W M R Q A
41  P E O G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y
41  P G O G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y
61  S E K F K G K A T L T A D K S A S T A Y
61  A E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y
81  M H L N S L T S E D S A V Y F C A R G R
81  M E L S S L R S E D T A V Y F C A R G R
101  D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S
101  D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S
121  A
121  S

```

FIG. 2B

```

1  E V O L Q Q S G P E L V K P G A S V K I
1  Q V O L V Q S G A E V K K P G S S V K V
21  S C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S
21  S C K A S G Y T F T D Y N M H W V R Q A
41  H G K S L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y
41  P G O G L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y
61  N Q K F K S K A T L T V D H S S S T A Y
61  N O K F K S K A T I T A D E S T N T A Y
81  M D V R S L T S E D S A V Y Y C A R G R
81  M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G R
101  P A M D Y W G O G T S V T V S S
101  P A M D Y W G O G T L V T V S S

```

FIG. 3B

```

1  Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T
1  D I O M T Q S P S S L S A S V G D R V T
21  M T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
21  I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
41  S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R
41  K A P K L L I Y D T S N L A S G V P S R
61  F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E
61  F S G S G S G T D T F T I S S L Q P E
81  D A A T Y Y C O Q W S T Y P L T F G A G
81  D I A T Y Y C O Q W S T Y P L T F G O G
101  T K L E L K
101  T K V E V K

```

FIG. 4A

```

1  D I V L T Q S P A T L S V T P G D S V S
1  E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
21  L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q O K P
21  L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q O K P
41  H E S P R L L I K Y A S O S I S G I P S
41  G O A P R L L I K Y A S O S I S G I P D
61  R F S G S G S G T D F T L S V N G V E T
61  R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P
81  E D F G M Y F C O Q S H S W F H T F G G
81  E D F A V Y Y C O Q S H S W F H T F G O
101  G T K L E I K
101  G T K V E I K

```

FIG. 5A

```

1  Q V O L K Q S G P G L V Q P S O S L S I
1  E V O L L E S G G C L V Q P G Q S L R L
21  T C T V S G F S V T S Y G V H W I R Q S
21  S C A A S G F T V T S Y G V H W V R Q A
41  P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N
41  P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y N
61  A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F F
61  A A F I S R F T I S R D H S K N T L Y L
81  K V N S L O P A D T A I Y Y C A R A G D
81  Q M N S L O A S D T A I Y Y C A R A G D
101  Y N Y D G F A Y W G O G T L V T V S A
101  Y N Y D G F A Y W G O G T L V T V S S

```

FIG. 4B

```

1  E V O L Q Q S G P E L V K P G A S H K I
1  Q V O L L E S G G C L V Q P G S S V R V
21  S C R A S V Y S F T C Y T M N W V K O S
21  S C R A S G Y S F T C Y T M N W V R Q A
41  H G Q N L E W I G L I N P Y N G G T S Y
41  P G K G L E W V G L I N P Y N G G T S Y
61  N O K F K G K A T L T V D K S S N T A Y
61  N O K F K G A V T V S L K P S F N Q A Y
81  M E L I S L T S A D S A V Y Y C T R R G
81  M E L S S L T S E D T A V Y Y C T R R G
101  F R D Y S M D Y W G O G T S V T V S S
101  F R D Y S M D Y W G O G T L V T V S S

```

FIG. 5B

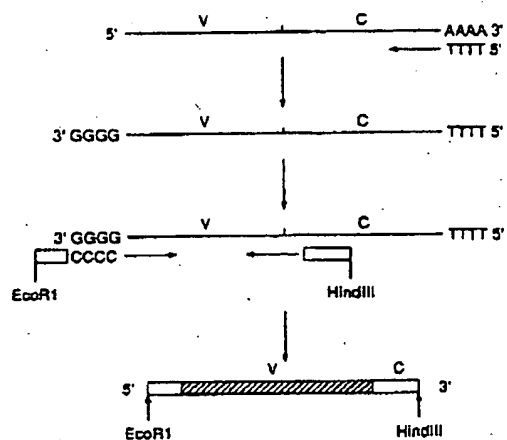


FIG. 6

ATGGATTTCAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATCTGTC 60
 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I L S
 AGAGGACAAATTCCTCAGCCAGTCTCAGCAATCATCTCTGCTCTCAGGGGCAAG 120
 A G Q I V L T Q S F A I H S A S P G E K
 GTCACCATGACCTGCAGTGCAGCTCAAGTGTAACTTTCATCTACTGCTGCTACGAGCAG 140
 V T M T C S G S S A V S F M Y W Y Q O R
 CCAGGATCTCCCGAGACTCTGATTTATGACACATCCAACTGGCTCTGCACTCCCT 200
 F G S S F R L L I Y D T S N L A S G V F
 GTTCCTTCAGTGCAGTGGGTCTGGGACTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAG 260
 V R F S G S G S G T T S T S L T T S R M L
 GGTGAAGATCTGCCACTTATTACTGCGAGCTGGAGTACTTACCCGCTCAGCTTCGT 320
 A E D A A T Y Y C Q Q M S T Y E L T F G
 GCTGCCACCAAGCTGGAGCTGAAA
 A G T K L E L K

FIG. 7A

ATGGCTGCTTGGGGCTGCTCTCTGCTGCTGACATTCGCAAGCTGTGCTATCTCCAG 60
 M A V L Q L L F C L V T F F S C V L S Q
 GTCCAGCTGAACAGCTCAGGACTGCGCTAGTGCAGCCCTCAGCAGCTGTCCATCAGC 120
 V O L X Q S G F G L V Q S S Q S L S I T
 TGCACATCTCTGCTTCTCAGTAAAGTTATGGTGTACACTGGATTGCGGACTCTCCA 180
 C T V S G F S V T S Y G V H W I R Q S F
 GGAAGGGCTGTGAGTGGCTGGAGTGATATGGAGTGTGGAGGACAGACTATATGCA 240
 G R C L E W L G V I M S G G S T D Y N A
 GCTTTCATATCCAGACTGACCATCAGCAAGGACCTCAAGACCCAGTTTCTTTTAA 300
 A T I S R L T I S K D N S K S Q V F F R
 GTGAACAGTCTGCAAGCTGCTCAGCAGCCATATACTATTGTGCCAGAGCTGGGACTAT 360
 V N S L Q F A D T A I Y Y C A R A G G C Y
 AATTACGACGTTTTCTTACTGGGGCAAGGACTCTGGTCACTGCTCTGCG 390
 M Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A

FIG. 7B

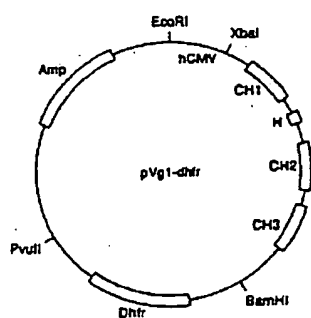


FIG. 8A

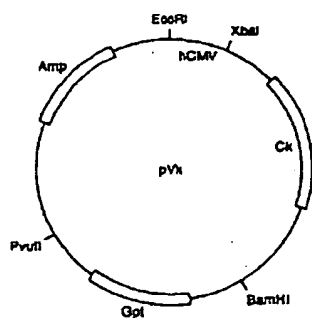


FIG. 8B

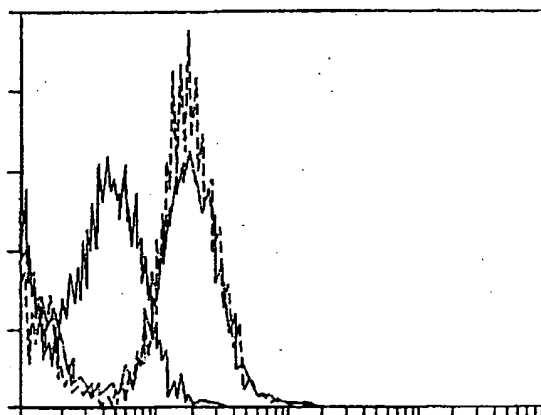


FIG. 9

1 D I O M T O S P S S L S V S V G D R V T
1 D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T
21 I T C Q A S Q N V N A Y L N M Y Q Q K P
21 I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q K P
41 G L A P K L L I Y G A S T R E A G V P S
40 G K A P K L L I Y D T S N L A S C V P S
61 R F S G S G S G T D E T F T I S S L Q P
60 R F S G S G S G T D Y T F T I S S L Q P
81 E D I A T Y Y C Q Q Y N H M P P T F G Q
80 E D I A T Y Y C Q Q H S T Y P L Y F G Q
101 G T K V E V K
100 G T K V E V K

FIG. 10A

1 A V Q I L L E S G G G L V O P G G S L R L
1 L V Q I L L E S G G G L V O P G G S L R L
21 S C A A S G P T F S A S A M S W V R Q A
21 S C A A S G P T V T S Y G V H W V R Q A
41 P G K G L E W V A W K Y E N G N D K H Y
41 P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y
61 A D S V N G R F T I S R N D S K N T L Y
60 N A A T I S R F T I S R D N S K N T L Y
81 L Q M N G L Q A Z V S A I Y Y C A R D A
80 L Q M N S L Q A E D T A I Y Y C A R A
101 G P Y V S P T F F A H W G Q C T L V T V
99 G D Y N Y D G F A Y W G Q C T L V T V
121 S S
118 S S

FIG. 10B

vc11
10 20 30 40 50 60
TAGTCTGTGG ACCAGCACT CCATATCACT CCAACCACT CGAGTCCCTT TCCAGAGCC
70 80 90 100 110 120
TGGCGGACC AGTGTACAC ATAACCTGTT ACGGTGAAC CACTGGGGC ACAAGACGT
130
CTCAGAGATC CTCTGGC

vc12
10 20 30 40 50 60
TGTGGGTGG ACAGACTAIA ATGCAGCTTT CATATCCAGA TTTACCATCA CCAGAGACAA
70 80 90 100 110 120
CAGCANGAAC ACACGTGATC TCCAAATGAA TAGCTGCA GCGGAGGACA CAGCATATTA
TTATTG

vp254
10 20 30 40 50 60
ACACTCTAGA CCACCATGGC TGTCTGGGG CTGCTCTCT GCTGTGTAC ATTCCCAAGC
70 80 90 100 110 120
TGTGTCTAT CCGCTGCA GCTGTAGAG AGTGTGGCG GTCTGTGCA GCGAGTAGA
130
TCTCTGAGAC

vp257
10 20 30 40 50 60
ACACTCTAGA AGTTAGACT CACCTGAGA GACACTGACC AGAGTCCCTT GGGCCAGTA
70 80 90 100 110
AGCAAAACG TGTAAATAT AGTCCCAAGC TCTGGCACA TATATATGG CTGTGTCC

FIG. 11B

vc13
10 20 30 40 50 60
TTCTCTGGT ACCAGTACAT GAACTTACA CTTCAGCTGC CACTGCAGGT GATGGTGACG
70 80 90 100
CGGTACACA CTGAGGCACT GAGGTAGAT GGAGACTGG TCATTTC

vc14
10 20 30 40 50 60
CATGTACTGG TACCAGGAGA AGCCAGGAAA AGCTCCGMA CTTCGTATT ATGACACATC
70 80 90 100 110 120
CAACTGGCT TCTGAGTCC CTTCGGCTT CAGTGGCACT GGGTCTGGA CGGATTACAC
130
CTTTACAATC TCTTCA

vc15
10 20 30 40 50 60
TGTGTCTAGA AAGGTGACT TACGTTTAC CTGACCTTG GTCTCTGAC GGAACGTGAC
70 80 90 100 110 120
CGGTAAGTA CTCTCTGCT GGCAGTAATA AGTGGCTATA TCTTCCGCT GAAGTGAACA
130
GATTGTAAAG GTGTAAT

vc16
10 20 30 40 50 60
CACATCTAGA CCACCATGGA TTTTCAAGTC CAGATCTTCA GCTTCTGCT AATCAGTGC
70 80 90 100
TCAGTCATAC TGTCCAGAGC AGATATTCRA ATGACCCGT CTGCATCT

FIG. 11A

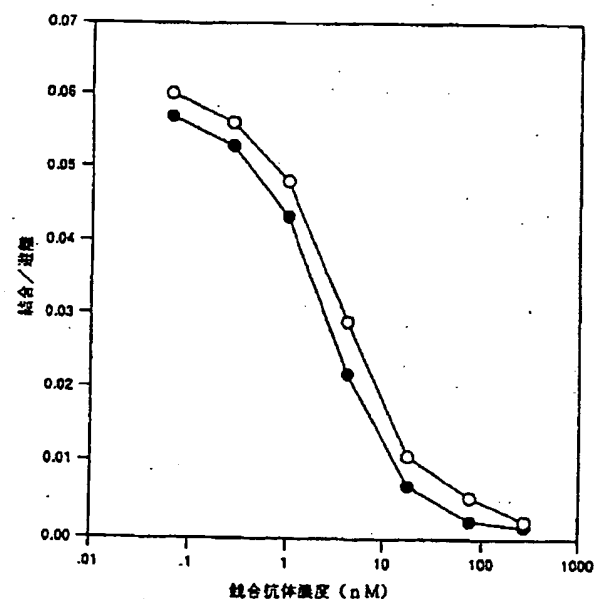


FIG. 12

特表平6-503963 (30)

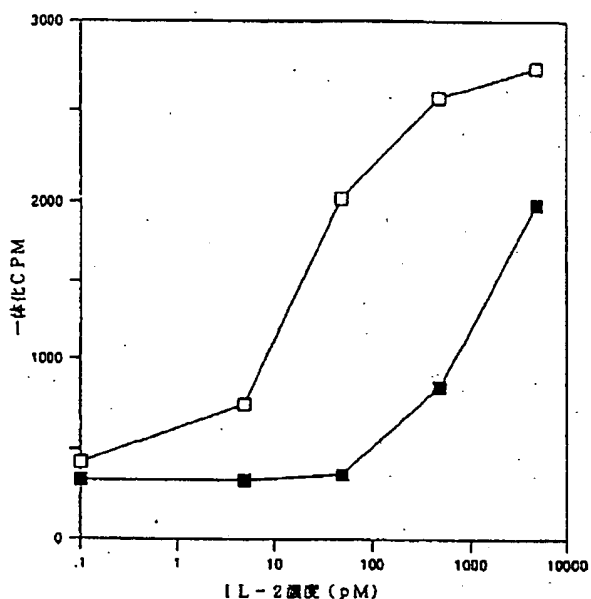


FIG. 13

```

1      5      10      15      20
1  E M I L V E S G G G L V K P G A S L K L
1  E V O L L E S G G G L V O P G G S L R L

21      25      30      35      40
21  S C A A S G T T F S H Y G L S M V R O T
21  S C A A S G T T F S H Y G L S M V R O A

41      45      50      52 a      55
41  S D R R L E W V A S I S R G G G R I Y S
41  P G K G L E W V A S I S R G G G R I Y S

60      65      70      75
60  P D N L K G R F T I S R E D A K N T L Y
60  P D N L K G R F T I S R N D S K N T L Y

80      82 a b c      85      90      95
80  L Q M S S L K S E D T A L Y Y C L R E G
80  L Q M N S L O A E D T A L Y Y C L R E G

97      100 a b c d k      105      110
97  I Y Y A D Y G F F D V W G T G T T V I V
97  I Y Y A D Y G F F D V W G Q G T L V T V

112      113
112  S S
112  S S
    
```

FIG. 14A

```

1      5      10      15      20
1  D I V L T O S P A S L A V S L G Q R A T
1  E I V M T O S P A T L S V S P G E R A T

21      25      27 a b c d      30      35
21  I S C R A S O S V S T S T Y N Y M H W Y
21  L S C R A S O S V S T S T Y N Y M H W Y

37      40      45      50      55
37  Q Q K P G Q P F K L L I K Y A S H L E S
37  Q Q K P G Q S F R L L I K Y A S H L E S

60      65      70      75
60  G V P A R F S G S G F G T D F T I N I H
60  G I P A R F S G S G F G T D F T I T I S

80      85      90      95
80  P V E E E D T V T Y Y C Q H S W E I P Y
80  R L E S E D F A V Y Y C Q H S W E I P Y

97      100      105      107
97  T F C G G G T K L E I K
97  T F C G G G T R V E I K
    
```

FIG. 14B

```

1      5      10      15      20
1  Q V Q L Q O S D A E L V K P G A S V K V
1  Q V Q L V O S G A E V N K P O S S V K V

21      25      30      35      40
21  S C K V S G Y T F T D H T I H M M K O R
21  S C K A S G Y T F T D H T I H M M A R G A

41      45      50      52 a      55
41  P E Q G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y
41  P G Q G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y

60      65      70      75
60  S E K T K G K A T L T A D K S A S T A Y
60  A E K T K G K A T I T A D E S T N T A Y

80      82 a b c      85      90      95
80  M H L S S L T S E D S A V Y F C A R G R
80  M E L S S L R S E D T A V Y F C A R G R

97      100 a b c d      105      110
97  D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S
97  D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S

113      113
113  A
113  S
    
```

FIG. 14C

```

1      5      10      15      20
1  D I V M T O S H K F M S T S V G D R V S
1  D I Q M T O S P S T L S A S V G D R V T

21      25      30      35      40
21  I T C K A S O D V G S A V V W H Q O K S
21  I T C K A S O D V G S A V V W H Q O K P

41      45      50      55
41  G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D
41  G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P S

61      65      70      75      80
61  R F T G S G S G T D F T L T I T M V Q S
61  R F T G S G S G T E F T L T I S S L Q P

81      85      90      95      100
81  E D L A D Y P C Q Q Y S I F P T F G A
81  D D F A T Y P C Q Q Y S I F P T F G C

101      105      107
101  G T R L E L K
101  G T K V E V K
    
```

FIG. 14D

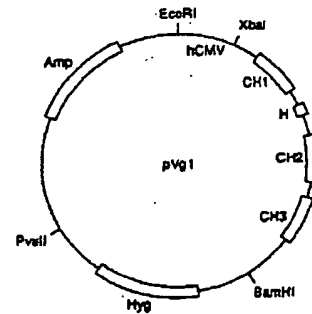


FIG. 15A

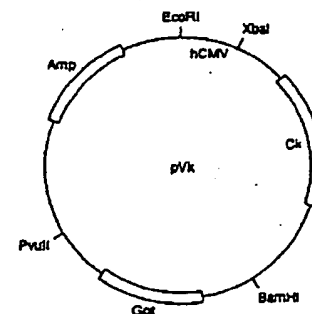


FIG. 15B

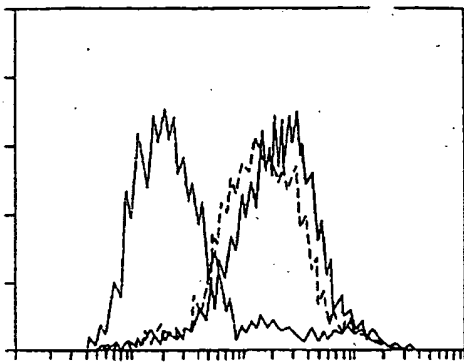


FIG. 16A

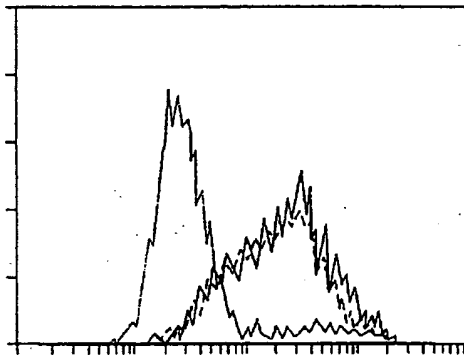


FIG. 16B

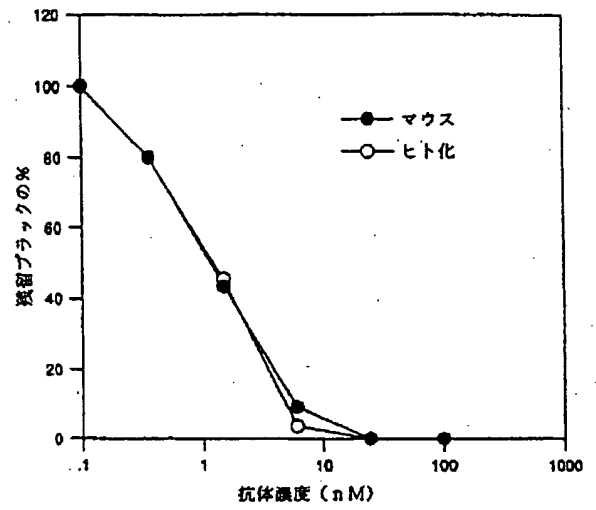


FIG. 17A

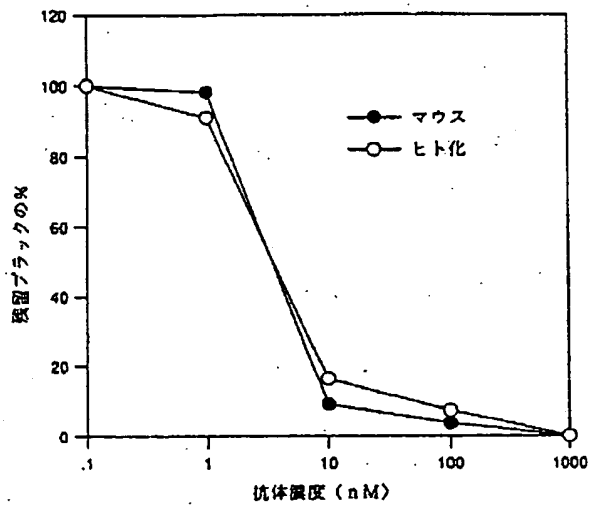


FIG. 17B

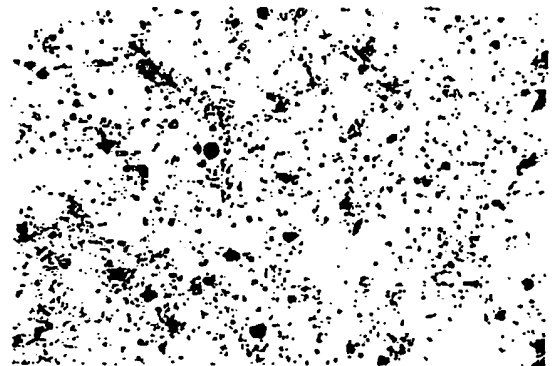


FIG. 18A



FIG. 18B

ATGGAGAAAGACACACTCTGGTATGGGCTCTCTGGGTTCCAGGTTCCACAGT
 MEKDTLLLLWVLLLVVFGSTG
 GACATTGTCTGACCAATCTCCAGCTCTTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC
 DIVLTQSPASLAVSLGQRA
 ATCTCTGAGAGCCAGCAAGTGTGTATATTATGGCAATTAGTTTATGAAGTGGTCT
 TSCRASESVDNYGTSFMNWF
 CAACAGAAACAGGACAGCCCAAACTCTCATCTATGTCATCAACCAAGGATCC
 OOKPFGQPPKLLIYAAASNGGS
 GGGTCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGCTCTGGGACAGACTTCAGGCTCAACATCCAT
 GVPARFSGSGSGTDFSLNHN
 CCTATGGAGGAGGATGATCTGCAATGTATTCTCTCAGCAAGTAAGGAGGTTGGTGG
 PHEEDDTAMYYFCQQSKEVFW
 ACGTTCGGTGGAGGACCAAGCTGGAATCAAA
 IFGGGTCKLEIK

FIG. 19A

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCTCTCTCTGTCAGGAATGCAGGCTCCACTCTAG
 HGMWNIFLFLLSGTYAGVHSE
 GTCAGGTTTCAGCAGTCAGGACCTCAGCTGGTGAACCTGGGGCTCAGTGAAGATATCC
 VGLQQSGFELVRFGASVVKIS
 TGCAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCAACATGCAGTGGTGAAGCAGAGCCAT
 CKASGYTFTDYNNHWNKDSH
 GGAAGAGCCTTGGTGGATGGATATTATCTTACAAATGGTGGTCTGGCTACAA
 GKSLEWNGYIYFNGGTGYM
 CAGAGTTTCAGCAGCAAGCCACATTGAGTGTAGCAATCTCCAGCAGGCTTACATG
 LFKERATLTVDNSSSTATM
 GAGCTCCGAGGCTGACATCTGAGGACTCTGAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGCTGG
 DVXSLTSEDSAVTYTCANGRF
 GGTATGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTCAGGCTCTCTCTCA
 AMDYNGCGTSTVTVSS

FIG. 19B

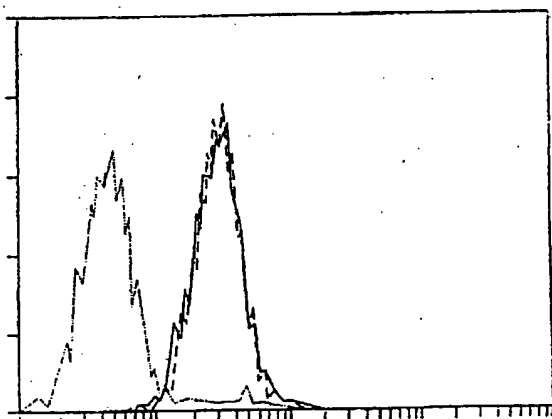


FIG. 21

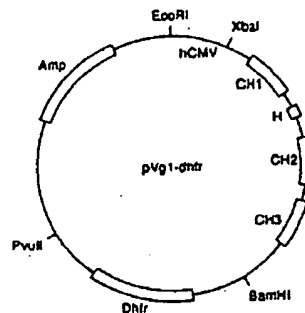


FIG. 20A

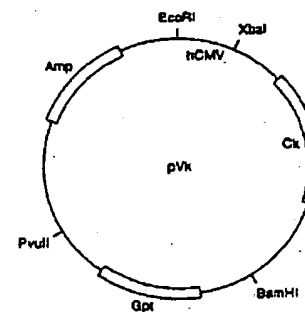


FIG. 20B

1 D I O M T O S P S T L S A S V G D R V T
 1 D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T
 21 I T C R A S Q S I N T W L A W Y
 21 I T C R A S E S V D N Y G T S F M N W F
 37 O O X P G G A P K L L N Y K A S S L E S
 41 O O X P G G A P K L L I Y A A S N O G S
 57 G V P S R F I G S G S G T E F T L T I S
 61 G V P S R F S G S G S G T D P T L T I S
 77 S L Q P D D F A T Y Y C O O Y N S D S K
 81 S L Q P D D F A T Y Y C O O S K E V P M
 97 M F C Q G T K V E V K
 101 I F G Q G T K V E I K

FIG. 22A

1 Q V O L V Q S G A E V K K P G S S V K V
 1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
 21 S C R A S G G T F S R S A I I M V R O A
 21 S C R A S G Y T F T D Y N M H W V R O A
 41 P G G L E M H G G I V P M F G P P N Y
 41 P G G L E M I G Y I Y P Y N G G T G Y
 61 A O K F Q G R V T I T A D E S T N T A Y
 61 N O K F K S K A T I T A D E S T N T A Y
 81 M E L S S L R S E D T A F Y F C A G G Y
 81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G
 101 G I T S P E Z Y N G G L V T V S S
 100 R P A M D Y M G O G I L V T V S S

FIG. 22B

ma1
10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CCACCATGG ATGGAGCTGG ATCTTTCTCT TCTCTCTCTC AGGAAGCTCT
70 80 90 100 110 120
GGGTCCACT CTCAGTTCA GCTGGTGCAG TCTGGAGCTG AGGTGAAGAA GCTGGGAGC
130
TCAGTGAAGG TT

ma2
10 20 30 40 50 60
AGCGGTACC ACCATTGTAA GGATAAATAT ATCCAAATCA TTCCAGGCTT TGGCCAGAG
70 80 90 100 110 120
CCTGCTCAC CCAGTGCATG TTGTAGTCAG TGAAGGTGTA GGCAGAGCT TTCCAGGAAA
130
CCTTCACTGA GCT

ma3
10 20 30 40 50 60
TGGTGTACC GGTACAAAC AGAAGTTCAA GAGCAAGGCC ACAAATTACAG CAGACGAGAG
70 80 90 100 110 120
TACTAACACA GGTACATGG AACTCTCCAG CTTGAGGTCT GAGGACACTG CA

ma4
10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA GGCATTCTT AACTGAAGAG ACAGTGACCA GAGTCCCTTG GCCCCAGTAG
70 80 90 100 110 120
TCCATAGCGG GCGGCTCTT TCGGCAGTAA TAGACTGCAG TGTCTCTAGA C

FIG. 23A

ma5
10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CCACCATGGA GAAAGACACA CTCTCTCTAT GGTCTCTGCT TCTCTGGGTT
70 80 90 100 110 120
CCAGGTTOCA CAGGTGACAT TCAGATGACC CAGTCTCCGA GCTCTCTGTC GGCATCAGTA
GG

ma6
10 20 30 40 50 60
TCAGAGCTT AGGAGCCTTC CCGGGTTTCT GTTGGAGCA GTTCAATAAG CTAATGCCAT
70 80 90 100 110 120
AATTGTGCAG ACTTTCGCTG GCTCTGATG TCATGTGTAC CTTCTCTCTT ACTGATGGG
AC

ma7
10 20 30 40 50 60
TCTAAGCTT CTGATTACG CTGCATCCAA CCAAGGCTCC GGGTACCTT CTGCTCTCTC
70 80 90 100 110 120
AGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCAATTCA TCTCTGCAGC CTGATGACT

ma8
10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CTTTGGATTG TACTTAAGTT TGATCTCCAC CTTGTCCCT TGACCGAAG
70 80 90 100 110 120
TCCACGGAC CTCTTACTT TGTGACAGT AATAGGTTGC GAAGTCATCA GGTCTGAC

FIG. 23B

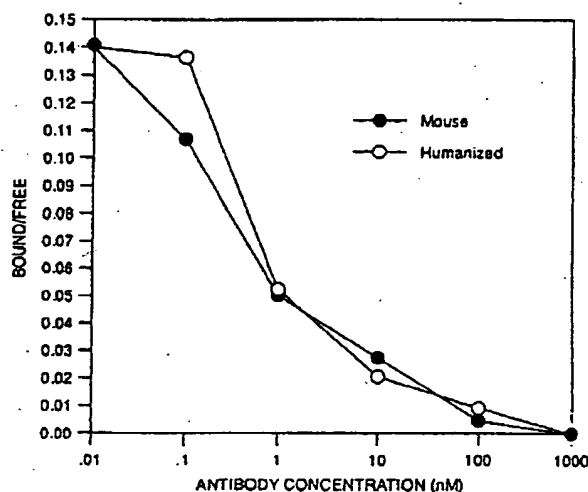


FIG. 24

30 60
ATGGTTTTCACACCTCAGATCTGAGCTTATGCTTTTGGATTTCAGCTCCAGAGGT
H V F T P Q I L G L M L F M I S A S R J
90 120
GATATTGCTAAGTCACTGCTCCAGCCCTCTCTGTGACCTCCGGAGATAGCTCTCACT
D I V L T Q S P A T L S V T P G D S V S
150 180
CTTCTCTCAGGCGCCAGCAAGTATTAGCAACACTACACTGGTATCAACAAATCA
L S C R A S O S I S H N L M W Y Q Q K S
210 240
CATGAGTCTCCAGGCTTCTCATCAGTATGCTTCCAGTCCATCTCTGGATCCCTCC
H E S F R L L I K Y A E Q S I S G I F S
270 300
AGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTCAGTCTCAGTGTCAACGGTGTGAGACT
F F S G S G S G T D F T L S V H G V E T
330 360
GAAGATTTCGAATGTATTTCTCTCAACACACTAACAGTTCGGCTCATACGTTCCGAGG
E O F G H Y F C D O S N S W P R T F G G
GGACCAAGCTGGAAATAAAA
G T R L E I K

FIG. 25A

30 60
ATGGGATGAGCTGGATCTTCTCTCTCTCTCTCAGGAACTGCGAGGTGCTCCACTCTGAG
H G N S W I F L F L L S G T A G V H S E
90 120
GTCAGCTGCAACAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCTGGAGCTTCAATGAAGATATC
V Q L Q O S G F E L V K P G A S H K S
150 180
TGCAAGGCTCTGTTACTCACTTCACTGGCTACACCACTGAACCTGCGTCAAGCAGAGGCT
C K A S V Y S T T G Y T M N W K Q S H
210 240
GACAGAACTTGAATGGAATGGAATCTTAACTCTTACAACTGCTGCTAGCTACAG
G C W L S W I G L I H F Y H G T S Y H
270 300
CAGAACTTCAAGGCGAAGGCAATTAAGCTAGAGCAAGTCAATCAACAGCTTACAT
L H F K G K A T L T V D K S S H T A Y H
330 360
GAGTCTCTGAGTCTGACATCTGGGACTCTGAGCTTATTAATCTACAGAGCGGCTT
E L S L T S A D S A V Y Y C T R R G F
390
CGAGACTATCTATGGACTACTGGGCTCAAGGAAGCTCAGCTCAGCTCTCTA
F T S H P T W G O G T S V T S S

FIG. 25B

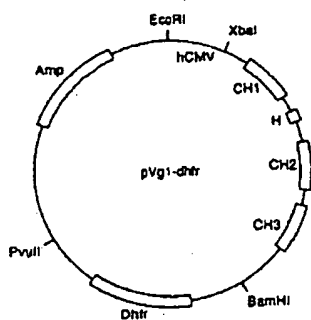


FIG. 26A

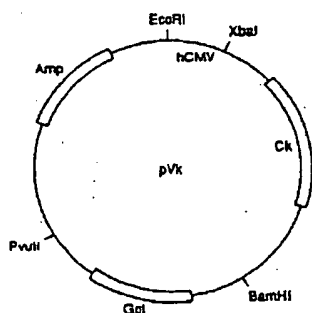


FIG. 26B

j16
 10 20 30 40 50 60
 TAGATCTAGA CCACCATGGT TTTACACCT CAGATCTAG GACTCATGCT CTTCTGGATT
 70 80 90 100 110 120
 TCAGCTOCA GAGTGAAAT TGTGCTAACT CAGTCTCCAG CCACCTAAG CTTATCACCG
 GGAGAAAGG

j17
 10 20 30 40 50 60
 TAGACAGAAAT TCACCGGTAC TTGATAAGTA GAGCTGAGC TTGTCCAGGT TTTTGTGGT
 70 80 90 100 110 120
 ACCAGTGTAG GTTGTGCTA ATACTTTGGC TGGCCCTGCA GGAAGTGTA GCGCTTCTC
 CCGGTGAT

j18
 10 20 30 40 50 60
 AAGAGATTTC ACCGCTGCA GTCCATCTCT GGAATACCG ATAGGTTGAG TGGAGTGA
 70 80 90 100 110 120
 TCAGGAGCAG ATTTCATCT CACAATAAGT AGGCTGAGC CGAAGATT TGC

j19
 10 20 30 40 50 60
 TAGATCTAGA GTTCAGAGA CTACTTACCT TTTACTCTA CTTGTGTC CTTGTGAGC
 70 80 90 100 110 120
 GATGAGGAG AACTGTACT CTTGTGAGA TATACACAG CAAATCTTC CCGGTC

FIG. 28A

特表平6-503963 (34)

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
 1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
 21 L S C R A S Q S V S S G Y L G W Y O O K
 21 L S C R A S Q S S I S N N L H W Y O O K
 41 P G Q A F R L L I Y G A S S R A T G I P
 40 P G Q A F R L L I Y A S S R A T G I P
 61 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
 60 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
 81 P E D F A V Y Y C Q Q Y G S L G R T F G
 80 P E D F A V Y Y C Q Q S N S W P H T F G
 101 Q G T K V E I K
 100 Q G T K V E I K

FIG. 27A

1 Q V O L N Q S G A E V K K P G S S V R V
 1 Q V O L V Q S G A E V K K P G S S V R V
 21 S C K T S C G T F V D Y K G L W V R Q A
 21 S C K A S G Y S F T G Y T M N W V R Q A
 41 P G K G L E W V G Q I P L R F N G E V K
 41 P G K G L E W V G L I N P Y N G G T S Y
 61 N P G S V V R V S V S L K P S F N Q A H
 61 N O K F K G R V T V S L K P S F N Q A Y
 81 M E L S S L F S E D T A V Y Y C A R E Y
 81 M E L S S L F S E D T A V Y Y C T R A
 101 G F D T S D Y Y Y Y W G Q G T L V T V
 100 G F R D Y S M D Y W G Q G T L V T V
 121 S S
 118 S S

FIG. 27B

j120
 10 20 30 40 50 60
 TATATCTAGA CCACCATGGG ATGAGCTGG ATCTTCTCT TCTCTCTGTC AGGAAGTGA
 70 80 90 100 110 120
 GGTGTCCACT CTCAGTCCA ACTGCTACAG TCTGAGCTG AGGTAAAAA GCGTGAAGT
 130
 TCAGTAAGAG TTTC

j121
 10 20 30 40 50 60
 TATATAGGTA CCACCATGCT AAGGATTAAT AAGTCCAAC CACTCAAGTC CTTTCCAGG
 70 80 90 100 110 120
 TGGCTGTCTC ACCCACTTCA TGGTATACCC ACTGAATGAG TATCCGAGG CTTTCCAGG
 130
 AACTCTTACT GAAC

j122
 10 20 30 40 50 60
 TATATAGGTA CCAGCTACAA CCAGAGTTC AAGGGACAG TTACAGTTC TTTGAGGCT
 70 80 90 100 110 120
 TCATTACAC AGGCTACAT GGAGCTCAGT AGTCTGTTT CTGAGACAC TGCAGT

j123
 10 20 30 40 50 60
 TATATCTAGA GGCATCTCT ACCTGAGGAG ACCGTGACTA AGTTCTTTG ACCCCAGTAC
 70 80 90 100 110 120
 TCCATAGAA AGTCTGAAA CCGGCTCTT CTACAGTAAT AGACTGAGT GTCTTC

FIG. 28B

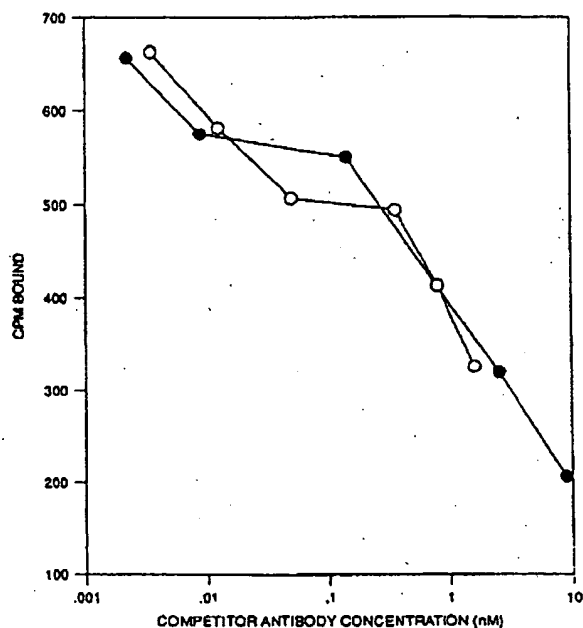


FIG. 29

```

      30                               60
ATGACATCAGTCTCTCTCTACAGTTACCGAGCACACAGGACCTCGCCATGGGATGGAGC
M T S L P S L Q L P S T Q D L A H G W S

      90                               120
TGTATCATCTCTCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCTCTCCAGGTCCAACATGCAG
C I I L F L V A T A Y G V L S Q V Q L Q

      150                              180
CAGCCTGGGGCTGACCTTGTGATGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCTGTGGCTTCT
Q P G A D L V H P G A P V K L S C L A S

      210                              240
GGCTACATCTTCACAGCTCTGGATAAAGTGGTGAAGCAGGCGCTGGACGAGGCTC
G Y I F T S S M I N W V K Q R P C R G L

      270                              300
GAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTCGATGGTGAAGTTCACATCAATCAAGATTCAAG
E W I G R I D P S D G E V H Y N Q D F K

      330                              360
GACAGGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCAGAGCCTACATCCAACCTCAACGC
D K A T L T V D K S S S T A Y I Q L N S

      390                              420
CTGACATCTGAGGACTCTGGGCTCTATTACTGTCTAGAGGATTTCTGCCCTGGTTTGT
L T S E D S A V Y Y C A R G F L P W F A

      450
GACTGGGGCCAGGAGCTCTGGTCACTGTCTGTCA
D W G Q G T L V T V S A
    
```

FIG. 30A

```

      30                               60
ATGCATCAGACCAGCATGGGCATCAAGATGGAATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCATA
M H Q T S M G I K H E S Q T L V F I S C

      90                               120
CTGCTCTGGTTATATGGTGTCTATGGGAACATTGTTATGACCCAACTCCCAATCCATG
L L W L Y G A D G N I V H T Q S P K S M

      150                              180
TACGTGTCAATAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAATAATGGTACT
Y V S I G E R V T L S C K A S E N V D T

      210                              240
TATGTATCCTGGTATCAACAGAAACAGAGCAGTCTCTAACTGCTGATATATGGGGCA
Y V S W Y Q Q K P E Q S P K L L I Y G A

      270                              300
TCCAACCGGTACACTGGGGTCCAGATCGCTTACGGGCACTGGATCTGCAACAGATTTC
S N R Y T G V H D R F T G S G S A T D F

      330                              360
ACTCTGACCATCAGCAGTGTGCGGCTGAAGACCTTGAGATTATCACTGTGGACAGAT
T L T I S S V Q A E D L A D Y H C G Q S

      390
TACAACATCCATTACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAG
Y N Y P E T F G S G T K L E I K
    
```

FIG. 30B

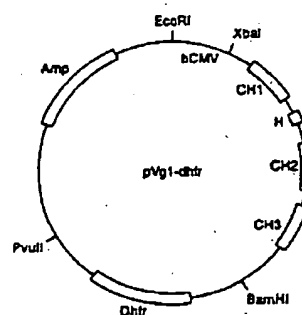


FIG. 31A

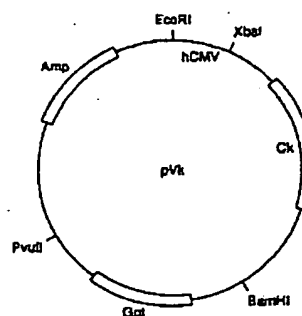


FIG. 31B

```

1  D I O M T O S P S T L S A S V G D R V T
1  D I O M T O S P S T L S A S V G D R V T
21  I T C R A S Q S I N T N L A M Y Q Q K P
21  I T C K A S E N V D T Y V S W Y Q Q K P
41  G K A P K L L M Y K A S S L E S G V P S
41  G K A P K L L I Y G A S N R Y T G V P S
61  A F I G S G S G T E F T L T I S S L C P
61  R F S G S G S G T D F T L T I S S L C P
81  D D F A T Y Y C Q Q Y N S D S K M F G
81  D D F A T Y Y C G Q S Y N Y P F T F G
100 Q G T K V E V K
100 Q G T K V E V K

```

FIG. 32A

```

1  Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
1  Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
21  S C K A S G G T F S R S A I I W V R Q A
21  S C K A S G Y I F T S S W I N W V R Q A
41  P G Q G L E W M G G I V P M F G P P K Y
41  P G Q G L E W M G R I D P S D G F V H Y
61  A Q K F Q G R V T I T A D E S T N T A Y
61  N Q D F K D R V T I T A D E S T N T A Y
81  M E L S S L R S E D T A F Y F C A G G Y
81  M E L S S L R S E D T A V Y V C A R G F
101 G I Y S P E E Y N G G L V T V S S
101 P M F A D M G Q G T L V T V S S

```

FIG. 32B

```

rh20
10 20 30 40 50 60
TTTTTCTAG ACCACATGG AGACOGATAC CCTCTCTGTA TGGCTCTGCT TCCTATGCTT
70 80 90 100 110
GGCTGCACT CTCAGGTGCA GCTTGTGAG TCTGGGGCTG AAGTCAAGAA ACC

```

```

rh21
10 20 30 40 50 60
TTTTGAATTC TCGAGAGCTT GTCCAGGGGC CTGCTTACC CAGTTATCC AGGAGCTAGT
70 80 90 100 110 120
AAAGATGTAG CCAGAAGCTT TCGAGGAGAC CTCACGGAG CTCACAGCTT TCTGACTTC

```

A

```

rh22
10 20 30 40 50 60
TTTTGAATTC TCGAGTGGAT GCGAAGGATT GATCTTCCG ATGCTGAAGT TCATACAAAT
70 80 90 100 110 120
CAAGATTCA AGGACCTGT TACAATTACA GCGACGAT CCACCAATAC AGCTTACATG
130
GAAGTGACA GCTTGAG

```

```

rh23
10 20 30 40 50 60
TTTTTCTAGA GCTTTAAGG ACTCACCTGA GGAGACTGTG ACCAGGCTTC CTGGGCECA
70 80 90 100 110 120
GTCAGCAAC CAGGGCAGAA ATCTCTTGG ACAGTAATAG ACTGCAGTGT CTTGTGATTT
130
CAGGCTGCTG AGTT

```

FIG. 33B

```

rh10
10 20 30 40 50 60
TTTTTCTAG ACCACATGG AGACOGATAC CCTCTCTGTA TGGCTCTGCT TCCTATGCTT
70 80 90 100 110
CCAGGATCA ACCGGAGATA TTCAGATGAC CCACTCTGCT TCGAAGCTCT CTGCT

```

```

rh11
10 20 30 40 50 60
TTTTAAGCTT GGGAGCTTTG CCTGGCTTCT GCTGATACCA GGATACATAA GTATCCACAT
70 80 90 100 110 120
TTTCACTGGC CTTCAGGCTT ATGGTGACCC TATCCGGGAC GCTAGCAGAG AGGTTCCAGC

```

```

rh12
10 20 30 40 50 60
TTTTAAGCTT CTAAATTATG GGGCATCCAA CCGGTACACT GGGGTACCTT CACGCTTCAG
70 80 90 100 110
TGGCAGTCCA TCTGGGACCG ATTTCAAGCT CACAATCAGC TCTCTGACAG CAGATGAT

```

```

rh13
10 20 30 40 50 60
TTTTTCTAG AGCAAAAGTC TACTTAAGTT TGACTCCAC CTGGTCCGCC TGAACGAAGC
70 80 90 100 110 120
TGAATGATA GTTGTAAGTC TGTCCGCACT AATAAGTGGC GAAATCATCT GGCTCCAGAG

```

FIG. 33A

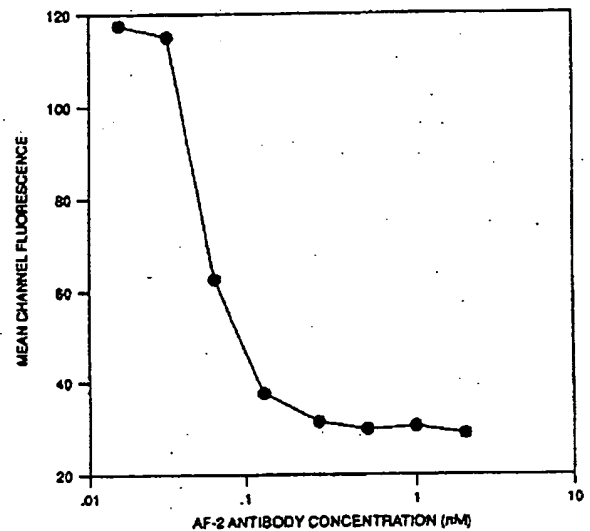


FIG. 34

国际调查报告

International Application No. PCT/US8100711

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN ACCORDANCE WITH THE INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (IPC) CLASSIFICATION

IPC Class: A61K 35/00, 35/06, 35/08, 35/10, 35/12, 35/14, 35/16, 35/18, 35/20, 35/22, 35/24, 35/26, 35/28, 35/30, 35/32, 35/34, 35/36, 35/38, 35/40, 35/42, 35/44, 35/46, 35/48, 35/50, 35/52, 35/54, 35/56, 35/58, 35/60, 35/62, 35/64, 35/66, 35/68, 35/70, 35/72, 35/74, 35/76, 35/78, 35/80, 35/82, 35/84, 35/86, 35/88, 35/90, 35/92, 35/94, 35/96, 35/98, 36/00, 36/02, 36/04, 36/06, 36/08, 36/10, 36/12, 36/14, 36/16, 36/18, 36/20, 36/22, 36/24, 36/26, 36/28, 36/30, 36/32, 36/34, 36/36, 36/38, 36/40, 36/42, 36/44, 36/46, 36/48, 36/50, 36/52, 36/54, 36/56, 36/58, 36/60, 36/62, 36/64, 36/66, 36/68, 36/70, 36/72, 36/74, 36/76, 36/78, 36/80, 36/82, 36/84, 36/86, 36/88, 36/90, 36/92, 36/94, 36/96, 36/98, 37/00, 37/02, 37/04, 37/06, 37/08, 37/10, 37/12, 37/14, 37/16, 37/18, 37/20, 37/22, 37/24, 37/26, 37/28, 37/30, 37/32, 37/34, 37/36, 37/38, 37/40, 37/42, 37/44, 37/46, 37/48, 37/50, 37/52, 37/54, 37/56, 37/58, 37/60, 37/62, 37/64, 37/66, 37/68, 37/70, 37/72, 37/74, 37/76, 37/78, 37/80, 37/82, 37/84, 37/86, 37/88, 37/90, 37/92, 37/94, 37/96, 37/98, 38/00, 38/02, 38/04, 38/06, 38/08, 38/10, 38/12, 38/14, 38/16, 38/18, 38/20, 38/22, 38/24, 38/26, 38/28, 38/30, 38/32, 38/34, 38/36, 38/38, 38/40, 38/42, 38/44, 38/46, 38/48, 38/50, 38/52, 38/54, 38/56, 38/58, 38/60, 38/62, 38/64, 38/66, 38/68, 38/70, 38/72, 38/74, 38/76, 38/78, 38/80, 38/82, 38/84, 38/86, 38/88, 38/90, 38/92, 38/94, 38/96, 38/98, 39/00, 39/02, 39/04, 39/06, 39/08, 39/10, 39/12, 39/14, 39/16, 39/18, 39/20, 39/22, 39/24, 39/26, 39/28, 39/30, 39/32, 39/34, 39/36, 39/38, 39/40, 39/42, 39/44, 39/46, 39/48, 39/50, 39/52, 39/54, 39/56, 39/58, 39/60, 39/62, 39/64, 39/66, 39/68, 39/70, 39/72, 39/74, 39/76, 39/78, 39/80, 39/82, 39/84, 39/86, 39/88, 39/90, 39/92, 39/94, 39/96, 39/98, 40/00, 40/02, 40/04, 40/06, 40/08, 40/10, 40/12, 40/14, 40/16, 40/18, 40/20, 40/22, 40/24, 40/26, 40/28, 40/30, 40/32, 40/34, 40/36, 40/38, 40/40, 40/42, 40/44, 40/46, 40/48, 40/50, 40/52, 40/54, 40/56, 40/58, 40/60, 40/62, 40/64, 40/66, 40/68, 40/70, 40/72, 40/74, 40/76, 40/78, 40/80, 40/82, 40/84, 40/86, 40/88, 40/90, 40/92, 40/94, 40/96, 40/98, 41/00, 41/02, 41/04, 41/06, 41/08, 41/10, 41/12, 41/14, 41/16, 41/18, 41/20, 41/22, 41/24, 41/26, 41/28, 41/30, 41/32, 41/34, 41/36, 41/38, 41/40, 41/42, 41/44, 41/46, 41/48, 41/50, 41/52, 41/54, 41/56, 41/58, 41/60, 41/62, 41/64, 41/66, 41/68, 41/70, 41/72, 41/74, 41/76, 41/78, 41/80, 41/82, 41/84, 41/86, 41/88, 41/90, 41/92, 41/94, 41/96, 41/98, 42/00, 42/02, 42/04, 42/06, 42/08, 42/10, 42/12, 42/14, 42/16, 42/18, 42/20, 42/22, 42/24, 42/26, 42/28, 42/30, 42/32, 42/34, 42/36, 42/38, 42/40, 42/42, 42/44, 42/46, 42/48, 42/50, 42/52, 42/54, 42/56, 42/58, 42/60, 42/62, 42/64, 42/66, 42/68, 42/70, 42/72, 42/74, 42/76, 42/78, 42/80, 42/82, 42/84, 42/86, 42/88, 42/90, 42/92, 42/94, 42/96, 42/98, 43/00, 43/02, 43/04, 43/06, 43/08, 43/10, 43/12, 43/14, 43/16, 43/18, 43/20, 43/22, 43/24, 43/26, 43/28, 43/30, 43/32, 43/34, 43/36, 43/38, 43/40, 43/42, 43/44, 43/46, 43/48, 43/50, 43/52, 43/54, 43/56, 43/58, 43/60, 43/62, 43/64, 43/66, 43/68, 43/70, 43/72, 43/74, 43/76, 43/78, 43/80, 43/82, 43/84, 43/86, 43/88, 43/90, 43/92, 43/94, 43/96, 43/98, 44/00, 44/02, 44/04, 44/06, 44/08, 44/10, 44/12, 44/14, 44/16, 44/18, 44/20, 44/22, 44/24, 44/26, 44/28, 44/30, 44/32, 44/34, 44/36, 44/38, 44/40, 44/42, 44/44, 44/46, 44/48, 44/50, 44/52, 44/54, 44/56, 44/58, 44/60, 44/62, 44/64, 44/66, 44/68, 44/70, 44/72, 44/74, 44/76, 44/78, 44/80, 44/82, 44/84, 44/86, 44/88, 44/90, 44/92, 44/94, 44/96, 44/98, 45/00, 45/02, 45/04, 45/06, 45/08, 45/10, 45/12, 45/14, 45/16, 45/18, 45/20, 45/22, 45/24, 45/26, 45/28, 45/30, 45/32, 45/34, 45/36, 45/38, 45/40, 45/42, 45/44, 45/46, 45/48, 45/50, 45/52, 45/54, 45/56, 45/58, 45/60, 45/62, 45/64, 45/66, 45/68, 45/70, 45/72, 45/74, 45/76, 45/78, 45/80, 45/82, 45/84, 45/86, 45/88, 45/90, 45/92, 45/94, 45/96, 45/98, 46/00, 46/02, 46/04, 46/06, 46/08, 46/10, 46/12, 46/14, 46/16, 46/18, 46/20, 46/22, 46/24, 46/26, 46/28, 46/30, 46/32, 46/34, 46/36, 46/38, 46/40, 46/42, 46/44, 46/46, 46/48, 46/50, 46/52, 46/54, 46/56, 46/58, 46/60, 46/62, 46/64, 46/66, 46/68, 46/70, 46/72, 46/74, 46/76, 46/78, 46/80, 46/82, 46/84, 46/86, 46/88, 46/90, 46/92, 46/94, 46/96, 46/98, 47/00, 47/02, 47/04, 47/06, 47/08, 47/10, 47/12, 47/14, 47/16, 47/18, 47/20, 47/22, 47/24, 47/26, 47/28, 47/30, 47/32, 47/34, 47/36, 47/38, 47/40, 47/42, 47/44, 47/46, 47/48, 47/50, 47/52, 47/54, 47/56, 47/58, 47/60, 47/62, 47/64, 47/66, 47/68, 47/70, 47/72, 47/74, 47/76, 47/78, 47/80, 47/82, 47/84, 47/86, 47/88, 47/90, 47/92, 47/94, 47/96, 47/98, 48/00, 48/02, 48/04, 48/06, 48/08, 48/10, 48/12, 48/14, 48/16, 48/18, 48/20, 48/22, 48/24, 48/26, 48/28, 48/30, 48/32, 48/34, 48/36, 48/38, 48/40, 48/42, 48/44, 48/46, 48/48, 48/50, 48/52, 48/54, 48/56, 48/58, 48/60, 48/62, 48/64, 48/66, 48/68, 48/70, 48/72, 48/74, 48/76, 48/78, 48/80, 48/82, 48/84, 48/86, 48/88, 48/90, 48/92, 48/94, 48/96, 48/98, 49/00, 49/02, 49/04, 49/06, 49/08, 49/10, 49/12, 49/14, 49/16, 49/18, 49/20, 49/22, 49/24, 49/26, 49/28, 49/30, 49/32, 49/34, 49/36, 49/38, 49/40, 49/42, 49/44, 49/46, 49/48, 49/50, 49/52, 49/54, 49/56, 49/58, 49/60, 49/62, 49/64, 49/66, 49/68, 49/70, 49/72, 49/74, 49/76, 49/78, 49/80, 49/82, 49/84, 49/86, 49/88, 49/90, 49/92, 49/94, 49/96, 49/98, 50/00, 50/02, 50/04, 50/06, 50/08, 50/10, 50/12, 50/14, 50/16, 50/18, 50/20, 50/22, 50/24, 50/26, 50/28, 50/30, 50/32, 50/34, 50/36, 50/38, 50/40, 50/42, 50/44, 50/46, 50/48, 50/50, 50/52, 50/54, 50/56, 50/58, 50/60, 50/62, 50/64, 50/66, 50/68, 50/70, 50/72, 50/74, 50/76, 50/78, 50/80, 50/82, 50/84, 50/86, 50/88, 50/90, 50/92, 50/94, 50/96, 50/98, 51/00, 51/02, 51/04, 51/06, 51/08, 51/10, 51/12, 51/14, 51/16, 51/18, 51/20, 51/22, 51/24, 51/26, 51/28, 51/30, 51/32, 51/34, 51/36, 51/38, 51/40, 51/42, 51/44, 51/46, 51/48, 51/50, 51/52, 51/54, 51/56, 51/58, 51/60, 51/62, 51/64, 51/66, 51/68, 51/70, 51/72, 51/74, 51/76, 51/78, 51/80, 51/82, 51/84, 51/86, 51/88, 51/90, 51/92, 51/94, 51/96, 51/98, 52/00, 52/02, 52/04, 52/06, 52/08, 52/10, 52/12, 52/14, 52/16, 52/18, 52/20, 52/22, 52/24, 52/26, 52/28, 52/30, 52/32, 52/34, 52/36, 52/38, 52/40, 52/42, 52/44, 52/46, 52/48, 52/50, 52/52, 52/54, 52/56, 52/58, 52/60, 52/62, 52/64, 52/66, 52/68, 52/70, 52/72, 52/74, 52/76, 52/78, 52/80, 52/82, 52/84, 52/86, 52/88, 52/90, 52/92, 52/94, 52/96, 52/98, 53/00, 53/02, 53/04, 53/06, 53/08, 53/10, 53/12, 53/14, 53/16, 53/18, 53/20, 53/22, 53/24, 53/26, 53/28, 53/30, 53/32, 53/34, 53/36, 53/38, 53/40, 53/42, 53/44, 53/46, 53/48, 53/50, 53/52, 53/54, 53/56, 53/58, 53/60, 53/62, 53/64, 53/66, 53/68, 53/70, 53/72, 53/74, 53/76, 53/78, 53/80, 53/82, 53/84, 53/86, 53/88, 53/90, 53/92, 53/94, 53/96, 53/98, 54/00, 54/02, 54/04, 54/06, 54/08, 54/10, 54/12, 54/14, 54/16, 54/18, 54/20, 54/22, 54/24, 54/26, 54/28, 54/30, 54/32, 54/34, 54/36, 54/38, 54/40, 54/42, 54/44, 54/46, 54/48, 54/50, 54/52, 54/54, 54/56, 54/58, 54/60, 54/62, 54/64, 54/66, 54/68, 54/70, 54/72, 54/74, 54/76, 54/78, 54/80, 54/82, 54/84, 54/86, 54/88, 54/90, 54/92, 54/94, 54/96, 54/98, 55/00, 55/02, 55/04, 55/06, 55/08, 55/10, 55/12, 55/14, 55/16, 55/18, 55/20, 55/22, 55/24, 55/26, 55/28, 55/30, 55/32, 55/34, 55/36, 55/38, 55/40, 55/42, 55/44, 55/46, 55/48, 55/50, 55/52, 55/54, 55/56, 55/58, 55/60, 55/62, 55/64, 55/66, 55/68, 55/70, 55/72, 55/74, 55/76, 55/78, 55/80, 55/82, 55/84, 55/86, 55/88, 55/90, 55/92, 55/94, 55/96, 55/98, 56/00, 56/02, 56/04, 56/06, 56/08, 56/10, 56/12, 56/14, 56/16, 56/18, 56/20, 56/22, 56/24, 56/26, 56/28, 56/30, 56/32, 56/34, 56/36, 56/38, 56/40, 56/42, 56/44, 56/46, 56/48, 56/50, 56/52, 56/54, 56/56, 56/58, 56/60, 56/62, 56/64, 56/66, 56/68, 56/70, 56/72, 56/74, 56/76, 56/78, 56/80, 56/82, 56/84, 56/86, 56/88, 56/90, 56/92, 56/94, 56/96, 56/98, 57/00, 57/02, 57/04, 57/06, 57/08, 57/10, 57/12, 57/14, 57/16, 57/18, 57/20, 57/22, 57/24, 57/26, 57/28, 57/30, 57/32, 57/34, 57/36, 57/38, 57/40, 57/42, 57/44, 57/46, 57/48, 57/50, 57/52, 57/54, 57/56, 57/58, 57/60, 57/62, 57/64, 57/66, 57/68, 57/70, 57/72, 57/74, 57/76, 57/78, 57/80, 57/82, 57/84, 57/86, 57/88, 57/90, 57/92, 57/94, 57/96, 57/98, 58/00, 58/02, 58/04, 58/06, 58/08, 58/10, 58/12, 58/14, 58/16, 58/18, 58/20, 58/22, 58/24, 58/26, 58/28, 58/30, 58/32, 58/34, 58/36, 58/38, 58/40, 58/42, 58/44, 58/46, 58/48, 58/50, 58/52, 58/54, 58/56, 58/58, 58/60, 58/62, 58/64, 58/66, 58/68, 58/70, 58/72, 58/74, 58/76, 58/78, 58/80, 58/82, 58/84, 58/86, 58/88, 58/90, 58/92, 58/94, 58/96, 58/98, 59/00, 59/02, 59/04, 59/06, 59/08, 59/10, 59/12, 59/14, 59/16, 59/18, 59/20, 59/22, 59/24, 59/26, 59/28, 59/30, 59/32, 59/34, 59/36, 59/38, 59/40, 59/42, 59/44, 59/46, 59/48, 59/50, 59/52, 59/54, 59/56, 59/58, 59/60, 59/62, 59/64, 59/66, 59/68, 59/70, 59/72, 59/74, 59/76, 59/78, 59/80, 59/82, 59/84, 59/86, 59/88, 59/90, 59/92, 59/94, 59/96, 59/98, 60/00, 60/02, 60/04, 60/06, 60/08, 60/10, 60/12, 60/14, 60/16, 60/18, 60/20, 60/22, 60/24, 60/26, 60/28, 60/30, 60/32, 60/34, 60/36, 60/38, 60/40, 60/42, 60/44, 60/46, 60/48, 60/50, 60/52, 60/54, 60/56, 60/58, 60/60, 60/62, 60/64, 60/66, 60/68, 60/70, 60/72, 60/74, 60/76, 60/78, 60/80, 60/82, 60/84, 60/86, 60/88, 60/90, 60/92, 60/94, 60/96, 60/98, 61/00, 61/02, 61/04, 61/06, 61/08, 61/10, 61/12, 61/14, 61/16, 61/18, 61/20, 61/22, 61/24, 61/26, 61/28, 61/30, 61/32, 61/34, 61/36, 61/38, 61/40, 61/42, 61/44, 61/46, 61/48, 61/50, 61/52, 61/54, 61/56, 61/58, 61/60, 61/62, 61/64, 61/66, 61/68, 61/70, 61/72, 61/74, 61/76, 61/78, 61/80, 61/82, 61/84, 61/86, 61/88, 61/90, 61/92, 61/94, 61/96, 61/98, 62/00, 62/02, 62/04, 62/06, 62/08, 62/10, 62/12, 62/14, 62/16, 62/18, 62/20, 62/22, 62/24, 62/26, 62/28, 62/30, 62/32, 62/34, 62/36, 62/38, 62/40, 62/42, 62/44, 62/46, 62/48, 62/50, 62/52, 62/54, 62/56, 62/58, 62/60, 62/62, 62/64, 62/66, 62/68, 62/70, 62/72, 62/74, 62/76, 62/78, 62/80, 62/82, 62/84, 62/86, 62/88, 62/90, 62/92, 62/94, 62/96, 62/98, 63/00, 63/02, 63/04, 63/06, 63/08, 63/10, 63/12, 63/14, 63/16, 63/18, 63/20, 63/22, 63/24, 63/26, 63/28, 63/30, 63/32, 63/34, 63/36, 63/38, 63/40, 63/42, 63/44, 63/46, 63/48, 63/50, 63/52, 63/54, 63/56, 63/58, 63/60, 63/62, 63/64, 63/66, 63/68, 63/70, 63/72, 63/74, 63/76, 63/78, 63/80, 63/82, 63/84, 63/86, 63/88, 63/90, 63/92, 63/94, 63/96, 63/98, 64/00, 64/02, 64/04, 64/06, 64/08, 64/10, 64/12, 64/14, 64/16, 64/18, 64/20, 64/22, 64/24, 64/26, 64/28, 64/30, 64/32, 64/34, 64/36, 64/38, 64/40, 64/42, 64/44, 64/46, 64/48, 64/50, 64/52, 64/54, 64/56, 64/58, 64/60, 64/62, 64/64, 64/66, 64/68, 64/70, 64/72, 64/74, 64/76, 64/78, 64/80, 64/82, 64/84, 64/86, 64/88, 64/90, 64/92, 64/94, 64/96, 64/98, 65/00, 65/02, 65/04, 65/06, 65/08, 65/10, 65/12, 65/14, 65/16, 65/18, 65/20, 65/22, 65/24, 65/26, 65/28, 65/30, 65/32, 65/34, 65/36, 65/38, 65/40, 65/42, 65/44, 65/46, 65/48, 65/50, 65/52, 65/54, 65/56, 65/58, 65/60, 65/62, 65/64, 65/66, 65/68, 65/70, 65/72, 65/74, 65/76, 65/78, 65/80, 65/82, 65/84, 65/86, 65/88, 65/90, 65/92, 65/94, 65/96, 65/98, 66/00, 66/02, 66/04, 66/06, 66/08, 66/10, 66/12, 66/14, 66/16, 66/18, 66/20, 66/22, 66/24, 66/26, 66/28, 66/30, 66/32, 66/34, 66/36, 66/38, 66/40, 66/42, 66/44, 66/46, 66/48, 66/50, 66/52, 66/54, 66/56, 66/58, 66/60, 66/62, 66/64, 66/66, 66/68, 66/70, 66/72, 66/74, 66/76, 66/78, 66/80, 66/82, 66/84, 66/86, 66/88, 66/90, 66/92, 66/94, 66/96, 66/98, 67/00, 67/02, 67/04, 67/06, 67/08, 67/10, 67/12, 67/14, 67/16, 67/18, 67/20, 67/22, 67/24, 67/26, 67/28, 67/30, 67/32, 67/34, 67/36, 67/38, 67/40, 67/42, 67/44, 67/46, 67/48, 67/50, 67/52, 67/54, 67/56, 67/58, 67/60, 67/62, 67/64, 67/66, 67/68, 67/70, 67/72, 67/74, 67/76, 67/78, 67/80, 67/82, 67/84, 67/86, 67/88, 67/90, 67/92, 67/94, 67/96, 67/98, 68/00, 68/02, 68/04, 68/06, 68/08, 68/10, 68/12, 68/14, 68/16, 68/18, 68/20, 68/22, 68/24, 68/26, 68/28, 68/30, 68/32, 68/34, 68/36, 68/38, 68/40, 68/42, 68/44, 68/46, 68/48, 68/50, 68/52, 68/54, 68/56, 68/58, 68/60, 68/62, 68/64, 68/66, 68/68, 68/70, 68/72, 68/74, 68/76, 68/78, 68/80, 68/82, 68/84, 68/86, 68/88, 68/90, 68/92, 68/94, 68/96, 68/98, 69/00, 69/02, 69/04, 69/06, 69/08, 69/10, 69/12, 69/14, 69/16, 69/18, 69/20, 69/22, 69/24, 69/26, 69/28, 69/30, 69/32, 69/34, 69/36, 69/38, 69/40, 69/42, 69/44, 69/46, 69/48, 69/50, 69/52, 69/54, 69/56, 69/58, 69/60, 69/62, 69/64, 69/66, 69/68, 69/70, 69/72, 69/74, 69/76, 69/78, 69/80, 69/82, 69/84, 69/86,

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 35/74		Z 7431-4C	
39/395		U 9284-4C	
	ABA	D 9284-4C	
	ADY	Y 9284-4C	
		S 9284-4C	
C 0 7 K 15/14		8517-4H	
// C 1 2 N 15/13			
(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N L, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, L K, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, SD, SE, SU

(72)発明者 コー, マン スン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 95014,
 キュバティーノ, ヨシノ プレイス
 10230

(72)発明者 シュナイダー, ウィリアム ビー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94041,
 マウンテン ビュー, ロレット ストリー
 ト 484

(72)発明者 ランドルフィ, ニコラス エフ.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 95035,
 ミルピタス, シーサイド ドライブ 246

(72)発明者 コーリン, カサリン エル.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94114,
 サンフランシスコ, ドーラーズ アベニュー
 1509

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)10月12日

【公表番号】特表平6-503963

【公表日】平成6年(1994)5月12日

【年通号数】

【出願番号】特願平4-503758

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

A61K 31/00 635

637

39/395

C07K 16/46

C12N 15/02

15/09

//(C12N 15/02

C12R 1:91)

【F I】

C12P 21/08

A61K 31/00 635 A

637

39/395

D

U

Y

C07K 16/46

C12N 15/00

C

A

特許請求の範囲

平成10年12月14日

特許庁長官 閣下

1. 事件の表示

平成4年特許願第50378号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94043, マウンテン ビュー、
ガルシア アベニユ 2375

名称 プロテイン デザイン ラブス、インコーポレイティド

3. 代理人

住所 〒560-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7825) 片瀬士 山本 秀実

電話 (大阪) 06-949-3910

4. 補正対象発明名

抗体の産生および増殖

5. 補正対象項目名

請求の範囲および明細書

6. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙のように補正します。

(2) 明細書第1頁15～19行目の「例えば、*ov12* (Lact. Jct.シリーズII) 及びAS
BIIは、*hyg*遺伝子含有BIIIII-*hgl*IIフラグメントを、*dhfr*遺伝子を含みそしてB
aIIII部に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した (Simons
等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983)).」を、「例えば、*ov12*-*dhfr*
はプラスミドpEgI (1990年9月28日提出の共有譲渡契約特許出願第07/590,274
号) より、*hyg*遺伝子含有BIIIII-*hgl*IIフラグメントを、*dhfr*遺伝子を含みとし
てBIIII部に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した (Simons
等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983)).」に補正します。

2. 以下を含む、請求項1に記載のヒト化免疫グロブリン:

前記マウスM195抗体の重鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域 (CD
R) およびヒト免疫グロブリン重鎖由来の可変領域フレームワークを含むヒト化
重鎖可変領域、および

前記マウスM195抗体の軽鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域 (CD
R) およびヒト免疫グロブリン軽鎖由来の可変領域フレームワークを含むヒト化
軽鎖可変領域。

3. 前記ヒト化重鎖可変領域が以下のAの下段に示される配列を含む、そして前
記ヒト化重鎖可変領域が以下のBの下段に示される配列を含む、請求項2に記載
のヒト化免疫グロブリン:

```

1  Q I V L T Q S P A I M S A S P G E R V T
1  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
21  M T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
21  I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
41  S S P R L L I Y D T S M L A S G V F V R
41  K A P K L L I Y D T S M L A S G V F S R
61  F S C S G S G T S Y S L T I S R M E A E
61  F S C S G S G T D I T F T I S S L Q F E
81  D A A T Y Y C Q O M S T Y P L T F G A G
81  D I A T Y Y C Q O M S T Y P L T F G Q G
101  T K L E L R
101  T K V E V R
    
```

A

請求の範囲

1. その軽鎖および重鎖がそれぞれ、以下のAの上段およびBの上段に示される
マウスM195抗体由来のヒト化免疫グロブリンであって、少なくとも10⁷M⁻¹
の結合親和力を有し、そしてヒトCD33抗原への結合についてマウス抗
体と競合する、ヒト化免疫グロブリン:

```

1  Q I V L T Q S P A I M S A S P G E R V T
1  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
21  M T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
21  I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
41  S S P R L L I Y D T S M L A S G V F V R
41  K A P K L L I Y D T S M L A S G V F S R
61  F S C S G S G T S Y S L T I S R M E A E
61  F S C S G S G T D I T F T I S S L Q F E
81  D A A T Y Y C Q O M S T Y P L T F G A G
81  D I A T Y Y C Q O M S T Y P L T F G Q G
101  T K L E L R
101  T K V E V R
    
```

A

```

1  Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I
1  E V Q L L E S G G G L V Q P G Q S L R L
21  T C T V S G F S V T S Y G V H W I R Q S
21  S C A A S G F T Y T S Y G V H W V R Q A
41  P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N
41  P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y N
61  A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F F
61  A A F I S R F T I S R D H S K N T L T L
81  K V N S L Q P A D T A I Y Y C A R A G D
81  Q M N S L Q A E D T A I Y Y C A R A G D
101  Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
101  Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S B
    
```

B

```

1  Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I
1  E V Q L L E S G G G L V Q P G Q S L R L
21  T C T V S G F S V T S Y G V H W I R Q S
21  S C A A S G F T Y T S Y G V H W V R Q A
41  P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N
41  P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y N
61  A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F F
61  A A F I S R F T I S R D H S K N T L T L
81  K V N S L Q P A D T A I Y Y C A R A G D
81  Q M N S L Q A E D T A I Y Y C A R A G D
101  Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
101  Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S B
    
```

B

4. 前記ヒト化免疫グロブリンが重鎖免疫グロブリンフレームワークに実質的に相
同であるヒトフレームワークを含む、請求項1から3のいずれかに記載のヒト化
免疫グロブリン。

5. 請求項1から4のいずれかに記載のヒト化免疫グロブリンを含む医薬組成物。

6. 細胞障害剤をさらに含む、請求項5に記載の医薬組成物。

7. 免疫反応抑制剤の処置に用いるための、請求項5または6に記載の医薬組成
物。